Plastidenvererbung und Organisation des Plastoms bei Arten der Gattung Epilobium

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Udo Klaus Schmitz
aus Düsseldorf

Düsseldorf
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543925_0076

Plastidenvererbung und Organisation des Plastoms bei Arten der Gattung Epilobium

Inaugural - Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Udo Klaus Schmitz
aus Düsseldorf

Düsseldorf
1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.V. Kowallik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Stubbe

Abkürzungsverzeichnis

A (G, C, T) TP	Adenosin (Guanosin, Cytosin, Thymidin)-triphosphat
B 1, 2, 3... (Ba, E, P, S)	Nach abnehmender Größe durchnumerierte DNA-Fragmente, die bei Verdauung der ptDNA mit Bgl I (Bam HI, Eco RI, Pvu II, Sal I) entstehen
BP 1, 2, 3... (BS, PS)	Nach abnehmender Größe durchnumerierte Subfragmente, die bei Doppelverdauung der ptDNA mit Bgl I/Pvu II (Bgl I/Sal I, Pvu II/Sal I) entstehen.
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Cyt	Cytochrom
d	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E.bill. (col., dur., glan., hirs., lanc., lut., mont., parv., wat.)	Epilobium billardierianum (coloratum, duriaei, glandulosum, hirsutum, lanceolatum, luteum, montanum, parviflorum, watsonii)
E.hirsutum (g,g/w,w)	Grüne, grün/weiß gescheckte, weiße Pflanze(n) von E.hirsutum
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid-Na_2 (Ethylendiamin-tetraessigsäure-Na_2)
F_1	erste Filialgeneration
kbp	Kilobasenpaar
LSU	Large subunit (große Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase)
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
mt	mating type (Geschlechtstyp)
NaAc	Natriumacetat
^{32}P	mit ^{32}P radioaktiv markiertes Phosphat
PS	Photosystem
PS II-1 (2, 3)	51 (44, 32)-kd Apoprotein des Photosystem II-Reaktionszentrums

ptDNA	Plastiden-DNA
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r	ribosomal(e)
Restriktionsenzyme:	Restriktionsendonukleasen aus:
Ava I	Anabaena variabilis
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens
Bgl I, Bgl II	Bacillus globigii
Eco RI	Escherichia coli
Hind III	Haemophilus influenzae
Kpn I	Klebsiella pneumoniae
Pst I	Providencia stuartii
Pvu II	Proteus vulgaris
Sal I	Streptomyces albus
Sma I	Serratia marcescens
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Sarkosinat	N-Lauroyl-Sarkosinat, Natriumsalz
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Sodium Chloride/Sodium Citrate (Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer)
TAP = TA-Puffer	Tris-Acetat-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TKS	Torfkultursubstrat
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	**EINLEITUNG**	4
2	**MATERIAL UND METHODEN**	7
2.1	Pflanzenmaterial und kreuzungsgenetische Methoden	7
2.1.1	Herkunft der verwendeten Arten	7
2.1.2	Anzucht und Kreuzungsmethoden	8
2.1.3	Schecken	9
2.1.4	Merkmalsauswertung	9
2.2	Elektronenmikroskopische Techniken	10
2.2.1	Präparation befruchtungsfähiger Pollenschläuche	10
2.2.2	Fixierung und Einbettung	10
2.2.3	Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie	11
2.3	Molekulargenetische Verfahren	12
2.3.1	Chemikalien und Lösungen	12
2.3.1.1	Chemikalien	12
2.3.1.2	Lösungen	12
2.3.2	Isolation von Plastiden-DNA	14
2.3.2.1	Plastidenisolation	14
2.3.2.2	Präparation von Plastiden-DNA	15
2.3.3	Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen	16
2.3.3.1	Verdauungsbedingungen	16
2.3.3.2	Verdauungen in Gegenwart niedrigschmelzender Agarose	16
2.3.3.3	Verdauung bakterieller Plasmide	17
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	17
2.3.4.1	Fragmentmusteranalyse und Molekulargewichtsbestimmung	17
2.3.4.2	Präparative Gelelektrophorese	18

2.3.5	Identifizierung homologer DNA-Abschnitte	19
2.3.5.1	DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter	19
2.3.5.2	Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Fragmente	20
2.3.5.3	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente an filtergebundene DNA	20
2.3.6	Klonierung ausgewählter Fragmente der Plastiden-DNA von **Epilobium**	21
2.3.6.1	Bakterienanzucht	21
2.3.6.2	Isolation von Plasmid-DNA	22
2.3.6.3	Insertion von Fragmenten der Plastiden-DNA in das Plasmid pEMBL8$^-$	22
2.3.6.4	Transformation der Bakterien und Klonselektion	23
3	**ERGEBNISSE**	25
3.1	Die Rolle plasmatischer Erbträger in interspezifischen Kreuzungen	25
3.1.1	Beschreibung der verwendeten Arten und Merkmalsauswertung an Hybridpflanzen	25
3.1.2	Vorkommen und Häufigkeit von Reziprokenunterschieden bei **Epilobium**-Artbastarden	33
3.2	Analyse des Plastidenerbgangs in Kreuzungsexperimenten mit grün/weiß gescheckten Pflanzen	40
3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Weitergabe plasmatischer Erbträger	44
3.3.1	Analyse des männlichen Gametophyten	44
3.3.2	Ultrastruktur der Spermazellen von **Epilobium**	44
3.4	Plastome der Gattung Epilobium und ihre Vererbung in interspezifischen Kreuzungen	48
3.4.1	Plastomvarianz bei zehn verschiedenen Epilobium-Arten	49

3.4.2	Erstellung von physikalischen Karten einiger Epilobium-Plastome	57
3.4.3	Genkartierung auf der zirkulären Plastiden-DNA	74
3.4.4	Bestimmung des Plastidenerbgangs durch Untersuchung der Plastiden-DNA interspezifischer Bastarde	81
3.4.4.1	Fragmentmusteranalyse der Plastiden-DNA von Arthybriden	81
3.4.4.2	Untersuchung des Plastidenerbgangs mittels radioaktiv markierter artspezifischer Fragmente der Plastiden-DNA	84
4	**DISKUSSION**	93
4.1	Die Organisation der Plastiden-DNA von Epilobium	93
4.2	Der Plastidenerbgang in der Gattung Epilobium	97
4.3	Die Frage der Bedeutung des Plasoms für die Entwicklungsstörungen von Epilobium-Artbastarden	104
5	**ZUSAMMENFASSUNG**	107
6	**LITERATURVERZEICHNIS**	109

1 EINLEITUNG

Epilobium ist eine weltweit verbreitete Gattung der Onagraceen, die schon in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts kreuzungsgenetisch intensiv untersucht wurde. Vor allem die umfangreichen Arbeiten von P. Michaelis an **Epilobium**, in denen zahlreiche Beweise für die Existenz plasmatischer Erbträger gesammelt wurden, lieferten einen wesentlichen Beitrag zur Revidierung der damals vorherrschenden Auffassung vom Monopol der Kernvererbung.

Indizien für eine plasmatische Vererbung basieren sowohl auf Untersuchungen grün-weiß gescheckter Pflanzen, die mutierte Plastiden enthalten (Baur, 1909) als auch auf der Beobachtung morphologischer Unterschiede in den Nachkommenschaften reziproker Kreuzungen zwischen normalgrünen Pflanzen.

Bereits Renner & Kupper (1921) postulierten, daß die bei Epilobium-Artbastarden gefundenen Reziprokenunterschiede durch plasmatische Faktoren bedingt werden. In zahlreichen späteren kreuzungsgenetischen Untersuchungen wurden verschiedene phänotypische Merkmale beschrieben, die bei Epilobium wahrscheinlich durch plasmatische Erbträger determiniert oder beeinflußt werden (Geith, 1924; Michaelis, 1929, 1931, 1932, 1940, 1948, 1951, 1958, 1959, 1962a; Michaelis & von Dellinghausen, 1942; Michaelis & Wertz, 1935).

Nachdem die genetische Kompartimentierung der pflanzlichen Zelle in Zellkern, Plastiden und Mitochondrien zweifelsfrei bewiesen war, stellte sich die Frage, welche plasmatischen Erbträger an der Ausprägung von welchen Merkmalen beteiligt sind. P. Michaelis versuchte in seinen späteren Arbeiten die Zuordnung von Merkmalen zu einem der Organellentypen durch eine statistische Auswertung des Verlaufs der somatischen Segregation in abgeänderten Sektoren zu bestimmen (Michaelis, 1955, 1962, 1966, 1967). Dieses in der Praxis aufwendige statistische Verfahren hat sich nicht durchsetzen können, da plasmatische Erbträger bei der Zellteilung zufallsmäßig verteilt werden und somit eine Anwendung des Verfahrens auf den Einzelfall nicht möglich ist.

Um neue Perspektiven für das Verständnis plasmatisch bedingter Merkmale zu eröffnen, unterzieht die vorliegende Arbeit das Plastom (Renner, 1934: Gesamtheit des in den Plastiden lokalisierten Erbmaterials) als Teil des Plasmons (von Wettstein, 1926: Gesamtheit des plasmatischen Erbmaterials) einer detaillierten Analyse; sie versucht durch die molekulargenetische Charakterisierung verschiedener Plastome und durch eine eingehende Untersuchung ihres Erbgangs die Voraussetzungen für die Identifizierung derjenigen Organellen zu schaffen, die den kreuzungsgenetischen Experimenten zufolge bei einem Teil der morphogenetischen und entwicklungsphysiologischen Prozesse eine Rolle spielen. Dazu werden Untersuchungen von Reziprokenunterschieden in interspezifischen Kreuzungen von Arten der Sektion **Epilobium** mit einer Plastomanalyse in den Parental- und Filialgenerationen verknüpft.

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Untersuchung des Plastidenerbgangs, da dieser nicht nur in bezug auf plasmatisch vererbte Merkmale, sondern auch im Hinblick auf eine phylogenetische Betrachtung der Plastomentwicklung von Bedeutung ist. Die Plastidenvererbung bei **Epilobium** wurde von Michaelis als rein maternal betrachtet (Michaelis, 1958). Da Michaelis die Plastidenvererbung nur mit gescheckten Pflanzen einer Spezies analysierte, können keine Aussagen über mögliche Variationen des Plastidenerbgangs bei verschiedenen Kombinationen plasmatischer und nuklearer Erbträger gemacht werden. Derartige Variationen des Plastidenerbgangs wurden z.B. bei Oenothera, einer eng verwandten Gattung von **Epilobium**, festgestellt. Der gewöhnlich biparentale Plastidenerbgang von Oenothera kann bei der Kombination bestimmter Plastome mit bestimmten Genotypen uniparental werden. Wenn aufgrund einer Inkompatibilität zwischen Genom und Plastom z.B. die Eizellenplastiden in der Zygote wesentlich schlechtere Entwicklungsbedingungen als diejenigen der Spermazellen haben, kann der Plastidenerbgang von **Oenothera** rein paternal werden (Stubbe et al., 1978).

Überdies zeigen Beispiele aus der Literatur (Simmonds, 1969; Clauhs & Grun, 1977; sowie Cresti et al., 1983; Stubbe, 1984), daß die Ergebnisse von Untersuchungen des Plastidenerbgangs in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode verschieden ausfallen können. Daher wurde der

Plastidenerbgang in der vorliegenden Arbeit mit kreuzungsgenetischen, elektronenmikroskopischen und molekulargenetischen Methoden analysiert.

Der in systematischer und phylogenetischer Hinsicht interessante Vergleich zwischen **Epilobium** und der nächstverwandten, durch cytogenetische Untersuchungen berühmt gewordenen Gattung **Oenothera**, ist in den siebziger Jahren durch die von amerikanischen Arbeitsgruppen durchgeführte cytogenetische Charakterisierung von Epilobium aktualisiert worden. Nachdem Mosquin (1968) bei **Epilobium**-Artbastarden reziproke Translokationen feststellte, führten Seavey & Raven (1977a, 1977b, 1978) umfangreiche Kreuzungsexperimente durch, in denen die Chromosomenkonfigurationen der meisten Arten der Sektion Epilobium untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Vergleich zwischen **Epilobium** und Oenothera auf das genetische Kompartiment der Plastide ausgedehnt, das bei **Oenothera** sowohl kreuzungsgenetisch (Renner, 1924; Stubbe, 1959) als auch molekulargenetisch (Gordon et al., 1981, 1982; Herrmann et al., 1983) gut charakterisiert ist. Die Gegenüberstellung der Plastomorganisation von **Epilobium** und **Oenothera** ist vor allem dadurch interessant geworden, daß bei Oenothera eine im Vergleich zu fast allen bisher untersuchten Pflanzen veränderte Anordnung plastidärer Gene festgestellt wurde (Herrmann et al., 1983).

Die folgenden Untersuchungen der Plastomorganisation,des Plastidenerbgangs und der Merkmalsausprägung bei reziproken Epilobium-Artbastarden sollen einen Beitrag zu den bisherigen Kenntnissen über plasmatische Vererbung liefern. Es besteht die Aussicht, daß in Zukunft die kombinierte kreuzungsgenetische und molekulargenetische Analyse plasmatischer Erbträger zu einem besseren Verständnis der komplexen Interaktion der drei genetischen Kompartimente der Pflanzenzelle führen wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PFLANZENMATERIAL UND KREUZUNGSGENETISCHE METHODEN

2.1.1 Herkunft der verwendeten Arten

Für Kreuzungsversuche und Plastomanalysen wurden die in Tabelle 1 zusammengestellten Arten[1)] der Gattung Epilobium, Sektion Epilobium verwendet. Hinter dem Namen des Sammlers ist jeweils die Sammlungsnummer für die betreffende Sippe angegeben. Sofern die Angabe eines Sammlers fehlt, handelt es sich um Samen aus botanischen Gärten der aufgeführten Städte.

Tabelle 1: Zahlencode und Herkunft der verwendeten Arten

SPEZIES	HERKUNFTSORT	SAMMLER	ANBAU-NR.
E.billardierianum Ser. ssp. billardierianum	Richmond, Nelson Neuseeland	W.B. Brockie Chr. 199322,M4	31
E.coloratum Biehler	Toronto, Kanada	Bot. Garten 149/82	48
E.duriaei Gay ex Godron	Puerto, Prov.Oviedo Spanien	Merxmüller & Grau 21360 M R 26258	43
E.glandulosum Lehm.	Toronto, Kanada	Bot. Garten 148/82	49
E.hirsutum L.	Cordoba, Spanien	P. Raven, s.n.	1
E.hirsutum L.	Siena, Pont d'Orgia, Italien	Bot. Garten 1419/77	2
E.hirsutum L.	Chatkal Reservat, Usbekistan, UDSSR	D. Wilkin, Hebb & Crovello 213(Mo)	3
E.hirsutum L.	Mazandaran, Iran	Wendelbo, Foroughi & Assadi, s.n. P. Hoch M1746(Mo)	4

[1)] Besonderer Dank gilt Prof. P.H. Raven und Dr. P.C. Hoch, die das gesamte Samenmaterial zur Verfügung stellten.

SPEZIES	HERKUNFTSORT	SAMMLER	ANBAU-NR.
E.lanceolatum Seb. et Mauri	Barcelona, L'Arra-bussuda, Spanien	Inst.Bot. de Barcelona	14
E.luteum Pursh	Linn County, Oregon, USA	P. Hoch 1323 (Mo)	24
E.montanum L.	Berlin, BRD	Bot. Garten 924	10
E.parviflorum Schreb.	Halle, DDR	P. Hoch M 1811 (Mo)	7
E.parviflorum Schreb.	Catalanien, Spanien	A. Romo & E. Sierra Raffols	8
E.parviflorum Schreb.	Berlin, BRD	Bot. Garten 928	12
E.watsonii Barbey var. parishii	Berlin, BRD	Bot. Garten 929	11

2.1.2 Anzucht- und Kreuzungsmethoden

Die zur Auswertung von Kreuzungen verwendeten Pflanzen wurden ausschließlich im Gewächshaus kultiviert, um konstante Anzuchtbedingungen zu gewährleisten und modifikative Merkmalsvariation auszuschließen. Vergleichende Untersuchungen wurden jeweils innerhalb der Pflanzen einer Vegetationsperiode durchgeführt; nur in Ausnahmefällen wurden Pflanzen für zusätzliche Beobachtungen zweijährig gehalten.

Die Samen wurden ab Anfang Februar auf feuchtem Filterpapier in Rollrandgläschen zur Keimung gebracht (durchschnittlich innerhalb von drei bis fünf Tagen) und als fünf bis zehn mm große Keimlinge in Schalen mit Torfkultursubstrat TKS 1 pikiert.

Da fast alle Arten der Sektion Epilobium autogam sind, war es notwendig, beim weiblichen Kreuzungspartner jeweils einige Tage vor der künstlichen Bestäubung das Androeceum zu entfernen. Anschließend wurde die Blüte mit einer lichtdurchlässigen Tüte vor Fremdbestäubung geschützt.

Reziproke Kreuzungen wurden jeweils mit identischen Kreuzungspart-

nern durchgeführt, um Unterschiede der Filialgeneration, die auf intraspezifische Variabilität zurückzuführen sind, gering zu halten.

2.1.3 Schecken

Aus den umfangreichen Aussaaten (ca. 3000 Pflanzen) für die ersten Kreuzungen und Plastidenisolationen waren zu Beginn der Untersuchungen zwei grün-weiß gescheckte Pflanzen von E.hirsutum isoliert worden. Bei einer dieser Schecken konnte ein Defekt in den Plastiden durch den Nachweis von Mischzellen und einem überwiegend maternalen Erbgang der Scheckung nachgewiesen werden. Diese Pflanze wurde durch Stecklinge vermehrt und diente als Ausgangsmaterial für alle Kreuzungsexperimente mit Schecken.

2.1.4 Merkmalsauswertung

Die Analyse des Phänotyps der verwendeten Arten sowie der intra- und interspezifischen Bastarde bezog sich sowohl auf Größen- und Formmerkmale, als auch auf Behaarungs- und Färbungsmerkmale. Die Ausprägung dieser Merkmalstypen wurde am Sproß, an den Laubblättern und der Blüte untersucht. Zusätzlich wurde die Fertilität der Gametophyten getestet. Dazu wurden Pollenkörner aus geöffneten Antheren in 70%igem Ethanol (70%) fixiert und die Pollenkörner nach Alexander (1969) gefärbt. Die Färbung gestattet eine klare Unterscheidung zwischen sterilen und potentiell vitalen Pollenkörnern. Die Fertilität der Samenanlagen wurde durch reichliche Bestäubung einiger Narben und anschließende statistische Auswertung des Samenansatzes ermittelt.

2.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE TECHNIKEN

2.2.1 Präparation befruchtungsfähiger Pollenschläuche

Narben und Griffel kastrierter Blüten wurden mit einer Klinge abgetrennt und sofort in 0,5%ige Agarose (SeaPlaque, s. 2.3.1), der ein für die Keimung von **Epilobium**-Pollen optimales Nährmedium (Schmitz, 1979) zugesetzt war, überführt. Nach der künstlichen Bestäubung der Narben wurden die Griffel so orientiert, daß unter dem Stereomikroskop bei Kontrollen in Abständen von 30 Minuten das Auswachsen der Pollenschläuche aus dem Griffel beobachtet werden konnte. Die nahe der Pollenschlauchspitze befindlichen Spermazellen konnten so in einer eng umgrenzten Zone von ca. 1 mm Kantenlänge fixiert werden.

2.2.2 Fixierung und Einbettung

Die Fixierung erfolgte in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, die Einbettung in Epon nach Luft (1961). Das Epoxidharzgemisch wurde aus 50% Epon 812, 25% Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) und 25% Methylnadicanhydrid (MNA) hergestellt; unmittelbar vor der Benutzung wurden dem Gemisch 1,5% Accelerator DMP 30 (2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)-phenol) zugesetzt. Alternativ wurde die Einbettung in ERL-4206 nach Spurr (1969) durchgeführt, bei der das Intermedium Propylenoxid entfällt, weil Ethanol und Spurr-Epon mischbar sind.

Zunächst wurden die Präparate in einer Lösung von 4% Glutaraldehyd in 0,05 M Na-Kakodylat/HCl pH 7,0 in kleine Stücke (2-3 mm) zerteilt und entluftet. Nach zwei Stunden wurde der Glutaraldehyd vollständig mit 0,05 M Kakodylatpuffer ausgewaschen (3 x 10 Minuten Inkubation), und die Objekte wurden in 1% OsO_4 (gelöst in 0,05 M Na-Kakodylat/HCl pH 7,0) für 4-12 Stunden überführt. Anschließend wurde über eine Alkoholreihe (20%, 50%, 70%, 90%, 96% und 100% Ethanol) für jeweils 10-15 Minuten entwässert. Über das Intermedium Propylenoxid wurden die Präparate in Propylenoxid-Epon Gemische (1:3, 1:1, 3:1) und schließlich in reines Epon (2x2 Stunden) überführt. Nach 24 - 48 Stunden bei

60°C war das Kunstharz vollständig polymerisiert.

2.2.3 Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie

Die Präparation der Ultradünnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Rawyler-Diatome-Diamantmessers am Ultramikrotom LKB III. Die Schnitte wurden auf Einlochträgerblenden (2x1 mm) aufgefangen (Schnittdicke 40-90 nm), die mit einem Trägerfilm aus Pioloform/Formvar bespannt waren. Sie wurden anschließend für 5 Minuten in Bleicitratlösung nach Reynolds (1963) kontrastiert und im Elektronenmikroskop Philips EM 300 untersucht. Die Abbildung geeigneter Schnitte erfolgte auf 6x9 cm Kodak Planfilmen.

2.3 MOLEKULARGENETISCHE VERFAHREN

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

2.3.1.1 Chemikalien

- (α-^{32}P) dATP und (α-^{32}P) dCTP (3000 Ci/mmol), Amersham UK
- Agar, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Agarose, hochschmelzend, SeaKem, Marine Coll.Div., Rockland, USA
- Agarose, niedrigschmelzend, SeaPlaque, Marine Coll.Div.,Rockland, USA
- Diäthylpyrocarbonat (Velcorin), Bayer AG, Leverkusen
- Hefeextrakt, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Natriumdodecylsulfat (SDS), Pierce, Rockford
- Nitrozellulose, BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel
- Trypton, Difco Laboratories, Detroit, USA

Alle übrigen Chemikalien waren p.a. Substanzen der Firmen Baker (Deventer, Holland), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München)

2.3.1.2 Lösungen

Bakterienanzucht: yt-Medium
85 mM NaCl, 0,8% Trypton, 0,5% Hefeextrakt

Bakterienanzucht: 2yt-Medium
85 mM NaCl, 1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt

Birnboim & Doily, Lösung-BD1
15 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA

Birnboim & Doily, Lösung-BD2
0,2 M NaOH, 1% SDS

Broth-Medium
10 mM Tris/HCl pH 7,4, 85 mM NaCl, 36 mM Glucose, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt

Elektrophoresepuffer (TAP)

40 mM Tris/CH_3COOH pH 7,5, 20 mM NaAc, 1 mM EDTA

Homogenisationsmedium zur Plastidenisolation

6 mM EDTA, 0,5 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 10 mM NaCl, 5 mM Mercaptoethanol, 44 mM MES, 0,33 M Sorbitol, 0,3% PVP, pH 6,1

Hybridisierungslösung

50% Formamid, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, 0,75 M NaCl, 75 mM NaAc, 40 µg/ml hitzedenaturierte und beschallte Heringssperm-DNA

Neutralisierungspuffer (NT-Puffer)

1 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, 0,05% SDS

"Nick-Translation"-Reaktionsansatz

50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Mercaptoethanol, 50 µg/µl BSA, 3 Einheiten DNA-Polymerase I, 20 µM nichtradioaktive Nukleotide, α-dATP und/oder α-dCTP (10 µCi), 0,5 bis 1 µg DNA.

Plastidenlysemedium

20% Ethanol, 3% SDS, 0,5 M NaAc, pH 6,0

SSC-Lösung (20x)

3 M NaCl, 0,3 M NaAc.

TE-Puffer (1)

10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

TE-Puffer (2)

50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM EDTA

Vorhybridisierungslösung

50% Formamid, 0,1% PVP, 0,1% Ficoll, 0,1% BSA, 0,75 M NaCl, 75 mM NaAc, 200 µg/ml hitzedenaturierte und beschallte Heringssperm-DNA

Waschlösung

50% Formamid, 0,75 M NaCl, 75 mM NaAc

2.3.2 Isolation von Plastiden-DNA

Nachdem Methoden zur Isolation plastidärer DNA, deren erfolgreiche Anwendung bei anderen Pflanzen bereits beschrieben ist (Kolodner & Tewari, 1975; Herrmann et al., 1975; Herrmann et al., 1980a), für die Isolation der DNA aus **Epilobium**-Plastiden keine befriedigenden Ergebnisse brachten, wurden verschiedene verfahrenstechnische Variationen getestet. Dazu gehörten die Reinigung der ptDNA durch Zentrifugation in KJ- und CsCl-Gradienten (Herrmann, 1982), sowie durch präparative Gelelektrophorese (s. 2.3.4.2). Obwohl auch bei einigen dieser Verfahren hochmolekulare, gut schneidbare ptDNA isoliert werden konnte, wird darauf nicht näher eingegangen, sondern nur die im Hinblick auf Qualität und Ausbeute der ptDNA optimale Isolationsmethode beschrieben.

2.3.2.1 Plastidenisolation

Optimale Ergebnisse bei der Plastidenisolation wurden mit unversehrten Laubblättern von Pflanzen, die noch nicht geblüht hatten, erzielt. Vor der Ernte wurden die Pflanzen 3-4 Tage verdunkelt (Stärkeabbau in den Plastiden) und nicht gegossen. Unmittelbar vor der Plastidenisolation wurden dem Homogenisationsmedium (Jensen & Bassham, 1966; Schneider und Hallier, 1970; Heber, 1973) Mercaptoethanol oder Natriumdithionit als Antioxidantien zugesetzt (Herrmann et al., 1980a). Die auf 4°C abgekühlten Blätter wurden im Waring Blendor mit eiskaltem Homogenisationsmedium (s. 2.3.1) im Verhältnis 1:5 versetzt und für 4 bis 5 Sekunden homogenisiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden möglichst schnell durchgeführt, da bei der Homogenisation von **Epilobium**-Blättern stark quellbare Schleimstoffe freigesetzt werden, die die Plastidenisolation erheblich behindern können:

druckbeschleunigte Filtration durch Nylongaze[2)]
(100 µm Maschenweite)
Filtration durch 2 Lagen Nylongaze[2)] (20 µm Maschenweite)
Differentielle Zentrifugation für 4-6 Minuten bei 3.200 xg

[2)] Schweizerische Seidengaze AG, Zürich

Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Sediments
Differentielle Zentrifugation für 3-5 Minuten bei 3.000 x g
Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Sediments

Ein Aliquot der Plastidensuspension wurde im Phasenkontrastmikroskop auf Intaktheit der Organellen untersucht (Kahn & von Wettstein, 1961). Anschließend wurde die Suspension auf Saccharosegradienten (15%-60% Saccharose in Homogenisationsmedium ohne PVP) aufgetragen und 50 Minuten bei 4°C mit 30.000 x g im Schwingbecherrotor zentrifugiert.

Die Plastidenbande wurde mit einer Pasteurpipette entnommen (bei 500 g Blättern ca. 150 ml), tropfenweise mit dem gleichen Volumen eiskalten TE-Puffers (1) (s. 2.3.1) versetzt und für 10 Minuten bei 4000 x g sedimentiert.

2.3.2.2 Präparation von Plastiden-DNA

Das Plastidensediment von 500 g Ausgangsmaterial wurde in 10 ml TE (1) resuspendiert, mit 25 ml Plastiden-Lysemedium, dem unmittelbar vorher 1 ml Diäthylpyrocarbonat beigemengt worden war, versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert (Laulhere & Rozier, 1976). Die dickflüssige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und bei 4.000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Die im wässrigen Überstand gelösten Nukleinsäuren wurden mit 200 mM Natriumacetat und dreifachem Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 15.000 x g wurde das Nukleinsäuresediment durch mehrfaches Waschen mit 70% Ethanol von präzipitierten Salzen gereinigt. Nach Verdampfen des Restalkohols im Vakuumtrockenschrank wurden die Nukleinsäuren in 1 ml TE-Puffer (2) (s. 2.3.1) gelöst und für 30 Minuten mit 10 µg RNAse bei 37°C versetzt. Anschließend wurde nach Zusatz von 10 µg Proteinase K für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Chloroformextraktion und Fällung gemäß obiger Anweisung wurde die ptDNA in 100 µl TE (2) rückgelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Aus 500 g Blattmaterial konnten zwischen 150 und 250 µg ptDNA isoliert werden.

2.3.3 Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen

2.3.3.1 Verdauungsbedingungen

Die Verdauungen von ca. 0.5 bis 1 µg ptDNA mit den Restriktionsendonukleasen Bam H I, Bgl I, Bgl II, Eco R I, Pst I, Pvu II und Sal I (bezogen von Boehringer-Mannheim oder Biolabs) wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in Reaktionsansätzen von 80 bis 100 µl mit 2 bis 4 Einheiten Enzym pro Ansatz durchgeführt. Die im Labor präparierten Enzyme Sal I (Arrand & Myers, 1978) und Bgl II (Duncan et al., 1978) wurden unter den gleichen Bedingungen wie die käuflichen Enzyme eingesetzt. Die ausreichende Enzymmenge für die vollständige Verdauung der DNA bei 37°C und einstündiger Inkubation wurde mit den verschiedenen Enzymen vorher ausgetestet. Verdauungen wurden durch Zugabe von 10 µl einer Lösung aus 0,1% Bromphenolblau in 50% wässrigem Glycerin zum Reaktionsansatz gestoppt. Anschließend wurden sie auf ein Agarosegel aufgetragen oder bei -20°C bis zur Elektrophorese gelagert. Bei Doppelverdauungen wurde zunächst mit dem bei niedrigerer Salzkonzentration optimal arbeitenden Enzym für 45 Minuten verdaut und nach Einstellen der für das zweite Enzym optimalen Salzkonzentration weitere 45 Minuten inkubiert.

2.3.3.2 Verdauungen in Gegenwart niedrigschmelzender Agarose

Das für die gewählte Kartierungsmethode erforderliche Nachverdauen der durch eine Restriktionsendonuklease (A) erzeugten DNA-Fragmente mit einer weiteren Restriktionsendonuklease (B) wurde nach Lawn et al. (1978) und Herrmann et al. (1980c) durchgeführt. Die von A erzeugten Fragmente der ptDNA wurden in SeaPlaque-Agarose-Gelen aufgetrennt und unter UV-Licht herausgeschnitten. Unter Berücksichtigung des Volumens der isolierten Banden und der internen Salzkonzentration des Gels wurden die optimalen Aktivitätsbedingungen für Enzym B eingestellt. Die Zugabe von Mercaptoethanol und Enzym (4-6 Einheiten/µg DNA) erfolgte erst, nachdem die Agarose für 90 Sekunden bei 71°C geschmolzen und die Probe in einen auf 37°C temperierten Wärmeblock überführt

worden war. Nach einer Stunde wurde die Reaktion gestoppt (s. 2.3.3.1) und die Probe sofort auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.3.3.3 Verdauung bakterieller Plasmide

Zur Isolation inserierter ptDNA-Fragmente aus bakteriellen Plasmiden wurden 20-30 µg Plasmid-DNA in Großansätzen von 0,5 ml verdaut. Um die notwendige Enzymmenge niedrig halten zu können, wurde die Inkubationszeit auf 2-3 Stunden verlängert. Die Plasmid-DNA wurde vor der Zugabe zum Verdauungspuffer für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, um die für den enzymatischen Zugriff ungünstige superhelikale Konformation zu lösen.

Zur Lokalisation von Genen auf der ptDNA von Epilobium wurden plastidäre Gene von Spinacia verwendet, die von Winter und Herrmann in den Vektor pBR322 inseriert worden sind (Herrmann et al., 1980b, 1983; Alt et al., 1983; Westhoff et al., 1983b)[3]. Die in diesen Publikationen beschriebenen Plasmide wurden nach obigem Verfahren verdaut und die gentragenden Fragmente nach gelelektrophoretischer Separation mit der in 2.3.4.2 behandelten Technik isoliert.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

2.3.4.1 Fragmentmusteranalyse und Molekulargewichtsbestimmung

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen erfolgte auf horizontalen Agarosegelen (20 x 20 x 0,5 cm; 0,4 bis 2% hochschmelzende Agarose gelöst in TAP (s. 2.3.1), der 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt). Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 15 µl 0,7%igem SeaPlaque-Agarosesol versetzt und mit bidestilliertem Wasser auf das Slotvolumen eingestellt, um optimale Laufbedingungen zu gewährleisten. Bei ca. 12°C wurde zu-

---

[3] Sowohl Plasmide als auch fertige Genproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R.G. Herrmann und seinen Mitarbeitern zur Verfügung gestellt.

nächst mit 5 Volt/cm pherographiert, bis die Bromphenolblaufront 1 cm ins Gel gewandert war. Dann wurde die Spannung auf die Hälfte reduziert und je nach Agarosekonzentration 12 bis 18 Stunden pherographiert.

Die Gele wurden 2 bis 3 Stunden gewässert und die unter UV-Licht (254 nm) fluoreszierenden Banden auf Polaroid-Negativfilm Nr. 665 oder auf Ilford HP5, 6 x 9 cm abgebildet (Rotlichtfilter 3, Blende 4,5, Belichtungszeit ca. 6 Minuten für Polaroid-Negative bzw. 1 bis 2 Sekunden für Ilford Negative).

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von ptDNA-Fragmenten wurden mehrere DNA-Längenstandards (Längenstandard II, Boehringer, Mannheim; Sal I-verdaute Spinat ptDNA (Herrmann et al., 1980c) und λ-DNA (Boehringer, Mannheim), die separat mit Hind III, Kpn I, Apa I und Sma I verdaut worden war) bei verschiedenen Agarosekonzentrationen kopherographiert.

2.3.4.2 Präparative Gelelektrophorese

Um Fragmente der ptDNA einzeln nachzuverdauen, wurden diese in Platten-Gelen aus 0,4 bis 0,7%iger niedrigschmelzender Agarose aufgetrennt, unter UV-Licht (360 nm) ausgeschnitten und weiterverarbeitet (s. 2.3.3.2).

Zur Isolation größerer Mengen eines Fragments (für Klonierungs- und Hybridisierungs-Experimente) wurde die mit dem entsprechenden Enzym verdaute ptDNA auf einem 0,5 - 0,7%igem Gel aus hochschmelzender Agarose in einen Breitbandslot aufgetragen und bis zur ausreichenden Trennung der DNA-Fragmente pherographiert. Die zu isolierende DNA-Fragment-Bande wurde unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel geschnitten und das herausgetrennte Agarosestück in einen an einem Ende zugeknoteten Dialyseschlauch gesteckt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit wenig Elektrophoresepuffer gefüllt und nach Verschluß seines offenen Endes in eine ausreichend große Probentasche eines Agarosegels gegeben (McDonnell et al., 1977). Nach dem Füllen der Probentasche mit Elektrophoresepuffer wurde mit 4 Volt/cm so lange pherographiert, bis sich die DNA aus dem Agarosestück quantitativ am Anodenende des Dia-

lyseschlauches gesammelt hatte. Um die DNA von der Wand des Dialyseschlauchs zu lösen, wurde für 30 Sekunden der Strom umgepolt. Der DNA-haltige Puffer wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 2-Butanol auf 1 ml eingeengt (Bieber & Stafford, 1975; Maniatis et al., 1982). Dann wurde die wässrige Phase mit Phenol-Chloroform und zur Entfernung von Phenolresten 2 bis 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die DNA wurde, wie in 2.3.3.2 beschrieben, mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in TE(2) rückgelöst.

Die Isolation von ptDNA-Fragmenten, die in Plasmide inseriert waren, erfolgte nach dem gleichen Verfahren durch Elektroelution der DNA aus hochschmelzender Agarose.

2.3.5 Identifizierung homologer DNA-Abschnitte

2.3.5.1 DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter

Die in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden gemäß der von Wahl et al. (1979) modifizierten Methode von Southern (1975) auf Nitrozellulosefilter transferiert. Zur Denaturierung und Fragmentierung der DNA wurde das Gel für jeweils 40 Minuten zunächst in 0,25 M HCl und anschließend in 0,5 M NaOH/1 M NaCl gelegt. Die Neutralisierung erfolgte für die gleiche Dauer in NT-Puffer.

Zum Transfer der DNA-Fragmente auf Nitrozellulosefilter wurde das Gel unter Zwischenschaltung von 2 Lagen Filterpapier auf ein Schwammtuch gelegt, das in eine 16 x SSC Lösung tauchte. Ein in 3 x SSC eingeweichter Nitrozellulosefilter wurde auf das Gel gelegt. Auf dem Filter wurden die Gelumrisse markiert und unter Zwischenschaltung weiterer Lagen Filterpapier ein ca. 15 cm hoher Stapel saugfähiger Papiertücher aufgebracht. Durch Auflegen eines Gewichts (300 bis 500 g) wurde ein ausreichender Sog erzeugt, um die DNA-Fragmente mit der SSC-Lösung an die Nitrozellulose diffundieren zu lassen. Je nach DNA-Menge pro Gel wurde nach ca. 4 Stunden ein neuer Nitrozellulosefilter aufgelegt und der Transfer für weitere 4 - 12 Stunden fortgesetzt. Die Filter wurden jeweils nach Beendigung des Transfers zur Entsalzung

20 Minuten auf 3 x SSC gelegt, 1 Stunde an der Luft getrocknet und anschließend für 5 Stunden im Trockenschrank bei 80°C gebacken (Southern, 1975).

2.3.5.2 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Fragmente

Zur radioaktiven Markierung der für Hybridisierungen vorgesehenen DNA-Fragmente wurde eine "Nick-Translation" in Gegenwart radioaktiver Nukleotide mit Hilfe der DNA-Polymerase I aus Escherichia coli (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Im Nick-Translations-Ansatz (s. 2.3.1) wurden 0,5 bis 1 µg DNA-Fragment für 3 Stunden bei 14°C in einem Volumen von 25 µl inkubiert (Rigby et al., 1977).

Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,1% Bromphenolblau in 50% wässrigem Glycerin wurden die radioaktiven DNA-Fragmente über eine Sephacryl-200 Säule oder eine Sephadex-100 Säule (beides Pharmacia) von den nichtinkorporierten Nukleotiden getrennt.

Um DNA-Einzelstränge zu erhalten, wurden die markierten DNA-Fragmente unmittelbar vor der Hybridisierung für 3 Minuten auf 95°C erhitzt.

2.3.5.3 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente an filtergebundene DNA

Zunächst wurden die getrockneten Nitrozellulose-Filter in einen Folienschlauch eingeschweißt und mit ca. 200 µl Vorhybridisierungslösung (s. 2.3.1) pro cm^2 Filter versetzt. Nach Zuschweißen des Folienschlauches wurde unter leichtem Schütteln 12 bis 24 Stunden bei 42°C inkubiert, um die noch DNA-freien Filterbereiche mit der Heringssperm-DNA der Vorhybridisierungslösung zu sättigen. Anschließend wurde der Puffer gegen ca. 50 µl Hybridisierungslösung pro cm^2 Filter ausgetauscht. Nach Zugabe der denaturierten, radioaktiv markierten ptDNA-Fragmente wurde der Folienschlauch zugeschweißt und für 12 bis 24 Stunden bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener, markierter Fragmente wurden die Filter nach der Hybridisierung zweimal 1 Stunde in Waschlösung (s. 2.3.1) bei 42°C leicht geschüttelt. Das Formamid

wurde durch Schütteln in 2 x SSC (20 Minuten) und 2-3 nachfolgenden Spülungen mit destilliertem Wasser entfernt.

Die Filter wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Röntgenfilm Kodak XAR-5 oder Fuji RX belegt. Bei Verwendung der Verstärkerfolie Quanta II (Du Pont) betrug die Expositionszeit 1 bis 3 Tage. Für die in 3.4.4.2 beschriebenen Versuche wurde ca. zwei Wochen lang mit Verstärkerfolie exponiert.

2.3.6 Klonierung ausgewählter Fragmente der Plastiden-DNA von Epilobium

Um die in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Experimente durchführen zu können, war es notwendig, ptDNA-Fragmente, die eine artspezifische Molekülgröße haben, zu klonieren. Sowohl vom größten Pvu II-Fragment der ptDNA von **E.lanceolatum**, das nur bei **E.montanum** eine weitere Pvu II-Schnittstelle besitzt, als auch vom fünften Sal I-Fragment der ptDNA von E.lanceolatum, das nur bei **E.watsonii** durch Fehlen einer Sal I-Schnittstelle zum zweiten Sal I-Fragment der ptDNA von **E.watsonii** gehört, wurden Bam HI-Subfragmente kloniert.

2.3.6.1 Bakterienanzucht

Der Escherichia coli-Stamm k12 71/18, der sich als Akzeptor für den Vektor pEMBL 8⁻ (Dente et al., 1983) bewährt hat, wurde für alle Klonierungsexperimente verwendet. Die Vorkultur plasmidhaltiger wie auch für die Transformation vorgesehener Bakterien erfolgte in sterilem Brothmedium (s. 2.3.1) bei 37°C im Lab-Shaker (Braun-Melsungen) unter starkem Schütteln (175 UpM) für 6 bis 12 Stunden. Für die Hauptkultur zu transformierender Bakterien wurde das glucosefreie 2yt-Medium (Rüther et al., 1981) verwendet, während die Hauptkultur plasmidhaltiger Bakterien in Broth-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin (steril filtriert) versetzt war (Maniatis et al., 1982, verändert), vorgenommen wurde.

2.3.6.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Birnboim & Doily (1979, modifiziert). Für den Aufschluß wurden die sedimentierten Bakterien für 30 Minuten in Lösung-BD 1 (1/10 des Volumens des Kulturmediums) in ein Eisbad gestellt und nach Zugabe des gleichen Volumens Lösung-BD 2 weitere 5 Minuten darin belassen. Nach Zufügen des doppelten Volumens einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,5) wurden für eine Stunde Proteine und Zellwandbestandteile gefällt. Die nach 10 Minuten bei 15.000 x g sedimentierten Teile wurden verworfen und der klare Überstand mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die gelösten Nukleinsäuren wurden mit Ethanol präzipitiert (s. 2.3.4.2). Die in TE(2) rückgelösten Nukleinsäuren wurden zur weiteren Reinigung der DNA mit Proteinase K und RNAse (s. 2.3.2.2) inkubiert und nach Phenol / Chloroform-Extraktion erneut mit Ethanol gefällt, gewaschen und rückgelöst. Die inserierten ptDNA-Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease Bam HI aus dem Vektor geschnitten (s. 2.3.3.3) und durch präparative Gelelektrophorese (s. 2.3.4.2) isoliert und gereinigt.

2.3.6.3 Insertion von Fragmenten der Plastiden-DNA in das Plasmid pEMBL 8⁻

Die für die Klonierung vorgesehenen Fragmente der ptDNA von E.lanceolatum (P 1 = 24,3 kbp und S 5 = 11,8 kbp) wurden zur besseren Ligierbarkeit mit Bam HI nachgeschnitten (geringere Fragmentgröße, kohäsive Enden). Ihre Isolation und Reinigung erfolgte durch präparative Gelelektrophorese, Phenol/Chloroform Extraktion und Präzipitation mit Ethanol (s. 2.3.4.2). In analoger Weise wurde der mit Bam HI im ß-Galactosidase-Gen geschnittene Vektor (Verdauungsbedingungen wie in 2.3.3.1 beschrieben) vor der Ligation gereinigt (Maniatis et al., 1982)

Zur Ligation von Vektor und ptDNA-Fragmenten wurden ca. 0,5 µg Fragment-DNA mit der gleichen Menge Vektor bei 4°C für 16 bis 24 Stunden in 30 µl sterilem Ligationspuffer (s. 2.3.1) mit 0,5 Einheiten T4-Ligase (Boehringer) inkubiert (Weiss et al., 1968, Dugaiczyck et

al., 1975). Anschließend wurde nach Zugabe der gleichen Menge ATP und T4-Ligase, die für den ersten Absschnitt der Ligation eingesetzt worden war, für weitere 4 Stunden bei 14°C inkubiert. Unmittelbar darauf wurde der Ligationsansatz zur Transformation der Bakterien verwendet.

2.3.6.4 Transformation der Bakterien und Klonselektion

Die Vorkultur der zur Transformation kultivierten Bakterien erfolgte wie in 2.3.6.1 beschrieben. Als Hauptkultur wurden 30 ml 2yt-Medium mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und 1 bis 1,5 Stunden bei 37°C mit 175 UpM geschüttelt, bis eine Extinktion von 0,2 bis 0,25 erreicht war (Weston et al., 1981). Die Extinktion wurde spektralphotometrisch mittels einer Parallelkultur gegen steriles Medium bei 600 nm gemessen (Gilford Spektralphotometer 250).

Nach der Sedimentation der Bakterien bei 4°C und 5.000 x g (5 Minuten) wurde das Bakteriensediment zunächst für 20 Minuten in 20 ml steriler eiskalter 0,1 M $MgCl_2$-Lösung aufgenommen und nach erneuter Sedimentation für den gleichen Zeitraum in 20 ml steriler eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung stehen gelassen (Mandel & Higa, 1970). Zur Kompetenzsteigerung verblieben die Bakterien für ca. 12 Stunden in 1 ml der letztgenannten Lösung (Dagert & Ehrlich, 1979). Anschließend wurden je 200 µl der Bakteriensuspension mit der zu transformierenden DNA eines Ligationsansatzes vereinigt, kräftig geschüttelt und für 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Nach der Bindung der DNA an die Bakterienzellwand erfolgte für 3 Minuten ein Wärmeschock bei 42°C. Die so transformierten Bakterien wurden mit 1 ml sterilem 2yt-Medium versetzt und bei 37°C für 2 Stunden ohne Schütteln inkubiert (Rüther et al., 1981). Danach wurde auf selektivem Agar (s.u.) ausplattiert und für 15 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die verwendeten Agarplatten enthielten 1,5% Agar in yt-Medium, das nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 46°C mit 40 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Isopropylthio-ß-D-galactosid (IPTG) und 20 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-Galactosid (X-Gal) versetzt wurde.

Der Zusatz der letztgenannten Substanzen ermöglicht neben der Selektion plasmidhaltiger Bakterien gleichzeitig die Selektion von

Kolonien, deren Plasmid ein Insert enthält. Solche Kolonien sind aufgrund des defekten ß-Galactosidase-Gens weiß, während plasmidhaltige Kolonien ohne Insert blau erscheinen (Rüther et al., 1981; Vieira & Messing, 1982; Dente et al., 1983).

3. ERGEBNISSE

3.1 DIE ROLLE PLASMATISCHER ERBTRÄGER IN INTERSPEZIFISCHEN KREUZUNGEN

Die Herstellung einer größeren Anzahl von Kreuzungen zwischen verschiedenen Epilobium-Arten schuf einerseits die Voraussetzungen für eine molekulargenetische Analyse des Plastidenerbgangs durch Charakterisierung der Plastome von Arthybriden (s. 3.4.4); andererseits ermöglichte sie die Untersuchung der Rolle plasmatischer Erbträger im Erbgeschehen von Epilobium. Die phänotypische Auswertung von Kreuzungen zwischen zehn Sippen von sechs verschiedenen Arten der Sektion Epilobium konzentrierte sich daher auf das Auftreten von Merkmalen, die unter dem Einfluß verschiedener Plasmotypen variieren oder ganz unter der Kontrolle plasmatischer Erbträger stehen. Da die Anisogameten höherer Pflanzen sich in der Regel in unterschiedlichem Ausmaß an der Bildung des Plasmons der Zygote beteiligen, führen plasmatisch kontrollierte Merkmale zu Reziprokenunterschieden in der Nachkommenschaft. Um reziprok verschiedene Filialgenerationen identifizieren zu können, wurde der Phänotyp aller Nachkommen hinsichtlich der unter 2.1.4 aufgeführten Merkmale ausgewertet. Kreuzungen zwischen Arten, die in Untersuchungen von P. Michaelis zu reziprok verschiedenen Bastarden führten[4)], wurden jeweils zwischen mehreren Sippen der betreffenden Arten durchgeführt. Zu Rückkreuzungen wurden nur reziprok verschiedene Bastarde oder solche mit außergewöhnlichen Merkmalen herangezogen.

3.1.1 Beschreibung der verwendeten Arten und Merkmalsauswertung an Hybridpflanzen

Die Beschreibung der Parentaltypen und die Ergebnisse der Kreuzungsexperimente sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt:

[4)] Leider ist das gesamte Pflanzenmaterial von P. Michaelis, insbesondere die Sippe E.hirsutum(Jena), die ein außergewöhnliches Plasmon hatte, trotz weltweiter Nachforschungen von Prof. P.H. Raven nicht mehr verfügbar.

Tabelle 2: Merkmalsauswertung von Kreuzungen und Rückkreuzungen intra- und interspezifischer Bastarde

Herkunft und Nummerncode der verwendeten Arten bzw. Sippen sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Symbole + und - beziehen sich auf die Ausprägung eines Merkmals:

++: sehr stark ausgeprägt
+ : deutlich ausgeprägt
± : schwach ausgeprägt
- : nicht ausgeprägt

Die gerundeten Prozentzahlen vor einer Zeile geben an, wieviele Nachkommen die in dieser Zeile aufgeführten Merkmale besaßen; die gerundeten Prozentzahlen hinter einem Merkmal geben an, wieviele Individuen der Nachkommenschaft die angegebene Ausprägung des betreffenden Merkmals zeigten.

Blattform:

el : elliptisch
la : lanceolat
obl : oblanceolat
ov : ovat
(ws): wuchsgestört

Blattrand:

bisr: biserrat
ga : ganzrandig
sl : serrulat
sr : serrat

Petalenfarbe:

hr : hellrosa
r : rosa
rr : rosarot
w : weiß

Petalenform:

em : emarginat
ob : obcordat

Narbe:

dl : dreilappig
vl : vierlappig
sf : säulenförmig

Tabelle 2.1: Phänotyp der verwendeten Arten

Spezies	Sproß		Laubblätter			Blüte	Petalen		Narbe	Fertilität (%)	
	Höhe (cm)	Behaarung	Form	Behaarung	Blattrand	Ø (cm)	Farbe	Gestalt		Pollen	Samenanlagen
E.hirsutum											
hirs (1)	90-110	++	la	++	sl	2,5-3,0	rr	ob	vl	100	ca. 95
(2)	90-110	+	la	++	sl	2,6-3,1	rr	ob	vl	100	ca. 95
(3)	80-100	+	obl	++	sl	2,9-3,2	rr	ob	vl	96	ca. 90
(4)	90-110	+	la	++	sl	2,7-3,0	rr	ob	vl	92	ca. 60
E.parviflorum											
parv (7)	50-70	+	obl	++	sl	1,0-1,2	hr	ob	vl	100	ca. 95
(8)	40-60	±	obl	±	sl	1,0-1,1	hr	ob	vl	100	ca. 90
(12)	40-60	±	obl	±	sl	1,0-1,1	hr	ob	vl	100	ca. 90
E.montanum											
mont (10)	70-90	-	ov	-	bisr	1,2-1,4	hr	ob	vl	92	ca. 80
E.lanceolatum											
lanc (14)	80-100	±	la	±	sr	1,1-1,3	r	em	sf	96	ca. 90
E.watsonii											
wat (11)	70-90	±	la	±	sl	0,7-0,9	hr	ob	sf	100	ca. 90

Tabelle 2.2: Phänotyp der Nachkommenschaft intraspezifischer Kreuzungen

Kreuzung	Sproß Höhe(cm)	Sproß Behaarung	Laubblätter Form	Laubblätter Behaarung	Laubblätter Blattrand	Blüte Ø(cm)	Petalen Farbe	Petalen Gestalt	Narbe	Fertilität (%) Pollen	Fertilität (%) Samenanlagen	Reziprokenunterschiede
hirs(3) x hirs(4)	80-100	+	la	++	sl	2,6-3,1	rr	ob	vl	100	ca. 95	+
hirs(4) x hirs(3)	80-100	+	la	++	sl	2,9-3,2	rr	ob	vl	0	ca. 90	
parv(8) x parv(12)	40-60	±	obl	±	sl	1,0-1,1	hr	ob	vl	96	ca. 80	-
parv(12)x parv(8)	40-60	±	obl	±	sl	1,0-1,1	hr	ob	vl	97	ca. 80	

Tabelle 2.3: Phänotyp der Nachkommenschaft interspezifischer Kreuzungen

hirs(1) x parv(12)	60-70	++	el,la	++	sl	2,2-2,5	r	ob	vl	70	ca. 70	+
parv(12)x hirs(1)	30-40	+	obl	±	sl	2,4-2,6	r	ob	vl	85	ca. 65	
hirs(4) x parv(8)	90-110	+	la	++	sl	2,5-2,9	r	ob	vl	96	ca. 75	-
parv(8) x hirs(4)	90-110	+	la	++	sl	2,0-2,4	r	ob	vl	97	ca. 85	
hirs(3) x parv(8)	40-50	+	obl	++	sl	2,2-2,4	r	ob	vl	97	ca. 65	-

Kreuzung	Sproß Höhe(cm)	Behaarung	Laubblätter Form	Behaarung	Blattrand	Blüte Ø(cm)	Petalen Farbe	Gestalt	Narbe	Fertilität (%) Pollen	Samenanlagen	Reziprokenunterschiede
parv(8) x hirs(3)	40-60	+	obl	++	sl	2,2-2,4	r	ob	vl	90	ca. 65	-
hirs(2) x wat 14%:	2-5	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
68%:	15-30	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
18%:	100-110	+	la	+	sl	2,0-2,1	r	ob	dl,vl	55	ca. 50	
wat x hirs(2) 80%:	letal											+
20%:	0,4-0,6	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
hirs(2) x mont	100-130	+	la	±	sl	2,1-2,3	hr	ob	vl	0	ca. 75	
mont x hirs(2)	90-110	+	la	±	sl	2,4-2,7	r	ob	vl	80	ca. 85	+
hirs(4) x lanc	90-100	+	la	±	sr	2,0-2,3	r	em	±vl	90	ca. 65	
lanc x hirs(4)	90-100	+	la	±	sr	1,8-2,2	rr	em	±vl	96	ca. 85	-
parv(7) x lanc	80-100	±	la	±	sr	0,8-1,0	hr	ob	vl	80	ca. 40	
lanc x parv(7)	80-100	±	la	±	sr	1,0-1,1	hr	ob	vl	85	ca. 40	-
parv(8) x lanc	80-100	±	la	±	sr	0,8-1,0	hr	ob	±vl	89	ca. 80	
lanc x parv(8)	80-100	±	la	±	sr	1,1-1,3	hr	ob	sf	82	ca. 80	-

Kreuzung	Spross Höhe(cm)	Behaarung	Laubblätter Form	Behaarung	Blattrand	Blüte Ø(cm)	Petalen Farbe	Gestalt	Narbe	Fertilität (%) Pollen	Samenanlagen	Reziprokenunterschiede
parv(8) x mont	70-90	-	el	±	bisr	1,0-1,2	hr	ob	vl	0	ca. 30	+
mont x parv(8)	70-90	-	el	±	bisr	1,1-1,3	hr	ob	vl	89	ca. 40	
parv(8) x wat	30%: 3-30	-	el(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	+
	70%: 30-70	-	el	-	sl	1,1-1,3	hr	ob	±vl	67	ca. 40	
wat x parv(8)	20%: 0,5-3	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
	80%: 3-15	-	el	-	ga	-	-	-	-	-	-	
mont x wat	90-110	-	el	-	sl	1,0-1,1	hr	ob	±vl	55	ca. 30	-
wat x mont	90-110	-	el	-	sl	1,1-1,3	hr	ob	±vl	46	ca. 30	
mont x lanc	60-100	-	la	±	bisr	1,4-1,6	hr	ob	sf	88	ca. 30	-
lanc x mont	60-100	-	la	±	bisr	1,3-1,5	hr	ob	sf	80	ca. 50	
wat x lanc	50%: 30-40	±	la(ws)	±	sr	-	-	-	-	-	-	±
	50%: 90-100	±	la	±	sr	1,0-1,1	hr	ob	sf	47	ca. 30	
lanc x wat	15%: 30-40	±	la(ws)	±	sr	-	-	-	-	-	-	
	85%: 70-80	±	la	±	sr	0,7-0,9	hr	ob	sf	42	ca. 30	

Tabelle 2.4: Phänotyp der Nachkommenschaft von Rückkreuzungen

Kreuzung	Sproß Höhe(cm)	Sproß Behaarung	Laubblätter Form	Laubblätter Behaarung	Laubblätter Blattrand	Blüte Ø(cm)	Petalen Farbe	Petalen Gestalt	Narbe	Fertilität (%) Pollen	Fertilität (%) Samenanlagen	Rezipr.-untersch.
hirs(1)/parv(12)												
(12x1)x1	90-110	+	la	++	sl	2,5	r(60%)rr(40%)	ob	vl	80	75	
1x(12x1)	90-110	+	la	++	sl	2,3-2,4	r(55%)rr(45%)	ob	vl	89	78	-
(1x12)x12	70-90	±	la	+	±sl	1,8-2,0	r(45%)rr(55%)	ob	vl	85	89	
12x(1x12)	80-90	±	la	+	±sl	1,8-2,0	r(40%)rr(60%)	ob	vl	80	83	-
hirs(2)/wat(11)												
(2x11)x2 20%	20-40	±	ov(ws)	±	ga	-	-	-	-	-	-	
80%	100-130	+	la	++	sl	2,0-2,3	hr(70%) r(30%)	ob	vl	84	ca. 70	
2x(2x11) 15%	30-40	±	ov(ws)	±	ga	-	-	-	-	-	-	-
85%	100-130	+	la	++	sl	2,0-2,3	hr(50%) r(50%)	ob	vl	84	ca. 70	
(2x11)x11 30%	20-40	±	ov(ws)	±	ga	-	-	-	-	-	-	
70%	100-130	+	la	++	sl	2,0-2,1	hr(60%) r(40%)	ob	±vl	75	ca. 50	
11x(2x11) 30%	5-20	±	ov(ws)	±	ga	-	-	-	-	-	-	-
70%	100-110	+	la	++	sl	2,0-2,1	hr(60%) r(40%)	ob	±vl	48	ca. 40	
parv(8)/wat(11)												
(8x11)x8 35%	10-20	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
65%	50-80	±	el	±	sl	1,2-1,4	hr	ob	vl	78	ca. 60	-

Kreuzung	Sproß Höhe(cm)	Sproß Behaarung	Laubblätter Form	Laubblätter Behaarung	Laubblätter Blattrand	Blüte Ø(cm)	Petalen Farbe	Petalen Gestalt	Narbe	Fertilität (%) Pollen	Fertilität (%) Samenanlagen	Rezipr.-untersch.
8x(8x11)	30% 5-20	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
	70% 50-80	±	el	±	sl	1,2-1,4	hr	ob	vl	83	ca. 70	-
(8x11)x11	20% 3-20	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	
	80% 60-100	±	el	±	sl	1,0-1,2	hr	ob	±vl	49	ca. 40	
11x(8x11)	30% 1-10	-	ov(ws)	-	ga	-	-	-	-	-	-	-
	70% 50-70	±	el	±	sl	1,1-1,3	hr	ob	±vl	56	ca. 60	
lanc(14)/wat(11)												
(14x11)x14	40% 30-40	-	la(ws)	-	sr	-	-	-	-	-	-	
	60% 70-90	±	la	±	sr	1,0-1,1	r	ob	sf	60	ca. 40	
14x(14x11)	25% 30-40	-	la(ws)	-	sr	-	-	-	-	-	-	-
	75% 90-100	±	la	±	sr	0,9-1,1	r	ob	sf	65	ca. 40	
(14x11)x11	30% 30-40	-	la(ws)	-	sr	-	-	-	-	-	-	
	70% 80-100	±	la	±	sr	0,8-1,0	hr	ob	sf	46	ca. 30	
11x(14x11)	40% 20-30	-	la(ws)	-	sr	-	-	-	-	-	-	-
	60% 80-90	±	la	±	sr	0,8-1,0	hr	ob	sf	45	ca. 40	
parv(8)/mont(10)												
(8x10)x10	40-50	-	±la	±	sr	0,6-0,8	w	em	vl	0	0	
(8x10)x8	80-100	-	la	+	bisr	1,0-1,2	hr	ob	vl	80	ca. 85	-
10x(10x8)	90-100	-	la	±	bisr	1,1-1,3	hr	ob	vl	75	ca. 80	
8x(10x8)	80-100	-	la	+	bisr	1,0-1,3	hr	ob	vl	88	ca. 85	-

3.1.2 Vorkommen und Häufigkeit von Reziprokenunterschieden bei Epilobium-Artbastarden

Bei intraspezifischen Kreuzungen traten in der ersten Filialgeneration nur Reziprokenunterschiede auf, die die Pollenfertilität betrafen. Der Bastard mit E.hirsutum(Mazandaran) als Mutter und E.hirsutum(Usbekistan) als Vater bildete keinen keimfähigen Pollen, während der Pollen des Bastards der reziproken Kreuzung zu hundert Prozent keimfähig war. In interspezifischen Kreuzungen waren die Bastarde von E.hirsutum(Siena) und E.montanum sowie von E.parviflorum(Catalanien) und E.montanum in bezug auf die Pollenfertilität reziprok verschieden. In diesen Kreuzungen war die F_1 mit E.montanum als Vater stets pollensteril. Nach der Meiose der Pollenmutterzellen degenerierten die Mikrosporen.

Morphologische Differenzen wurden zwischen den reziproken Bastarden von E.hirsutum(Cordoba) und E.parviflorum(Berlin) registriert. Hier war die durchschnittliche Sproßhöhe und die Blattgestalt betroffen. Der Bastard mit E.hirsutum als Mutter entwickelte einen 60 bis 70 cm hohen Sproß und hatte elliptische serrulate Blätter, während der reziproke Bastard eine Sproßhöhe von 30 bis 40 cm zeigte und oblanceolate, nur schwach gezähnte Blätter hatte (Abb. 1).

Auffällig waren Wuchsstörungen und Blattkräuselungen, die bei fast allen interspezifischen Kreuzungen mit E.watsonii auftraten. Die Intensität der Wuchsstörungen war bei den reziproken Bastarden dieser Kreuzungen jeweils verschieden. Besonders deutlich war der Reziprokenunterschied zwischen Bastarden von E.hirsutum x E.watsonii und E.watsonii x E.hirsutum. Während bei der Kreuzung mit E.hirsutum als Mutter etwa jede fünfte Pflanze normal entwickelt war und 68% nur mittelmäßig gestört waren, ergab die reziproke Kreuzung zu 80% taube Samen, also letale Nachkommen und zu 20% extrem wuchsgestörte F_1-Pflanzen, die nur wenige mm groß wurden und nach wenigen Wochen degenerierten (Abb. 2).

In der Kreuzung E.parviflorum(Catalanien) x E.watsonii zeigte etwa ein Drittel der Bastarde Wuchsstörungen; einige dieser Pflanzen bildeten sogar fertile Blüten. Die reziproke Kreuzung dagegen brachte aus-

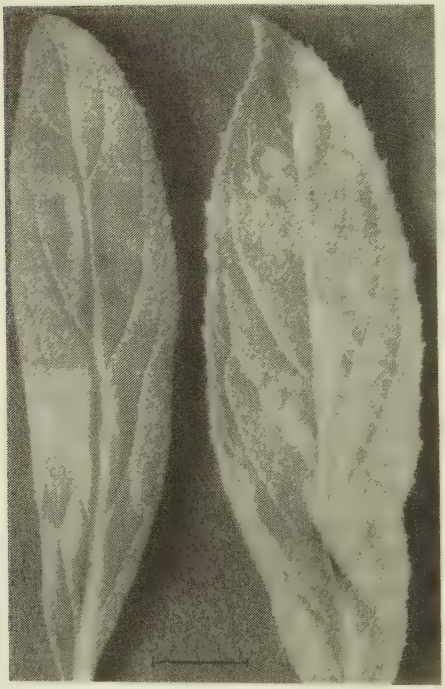


Abb. 1: Voll entwickeltes Laubblatt einer E.**hirsutum** (Cordoba) x E.**parviflorum** (Berlin)-Pflanze (rechts) und des reziproken Bastards (links). Die Blattform und die Blattbehaarung sind in den reziproken Nachkommenschaften verschieden. Balken: 1 cm.

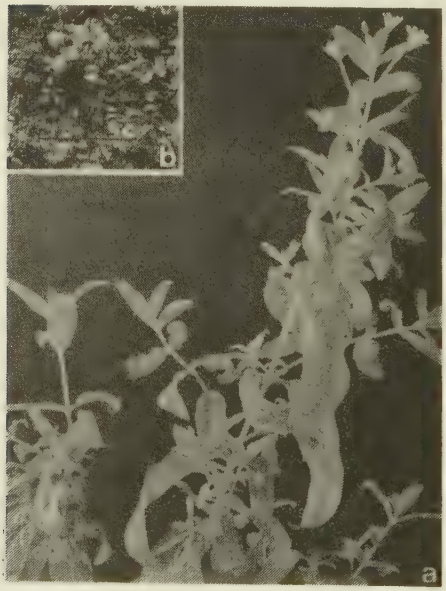


Abb. 2: Nachkommen der Kreuzung E.**hirsutum** (Siena) x E.**watsonii** (a) und der reziproken Kreuzung (b). Die Bastarde mit E.**watsonii** als Mutter sind extrem wuchsgestört und entwickeln sich nicht über das dargestellte Stadium hinaus (b). Die Bastarde mit E.**hirsutum** als Mutter sind dagegen nur schwach wuchsgestört (linke Pflanze) oder normal entwickelt (hier durch Überbelichtung gelblich). Balken: 1 cm.

schließlich kleinwüchsige Bastarde hervor, die z.T. starke Blattkräuselungen hatten und alle nicht zur Blüte kamen (Abb. 3).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen interspezifischen Kreuzungen mit E.watsonii zeigte die Kreuzung dieser Spezies mit E.lanceolatum keine qualitativen Reziprokenunterschiede in der F_1; lediglich die Anzahl wuchsgestörter Nachkommen variierte: 10% bis 20% wuchsgestörte Pflanzen mit stark gekräuselten, dunkelgrün glänzenden Blättern traten in der Kreuzung mit E.lanceolatum als Mutter auf. Die reziproke Kreuzung mit **E.watsonii** als Mutter führte dagegen bei 50% der Nachkommen zu den gleichen Wuchsstörungen. Im floralen Bereich wurden lediglich reduzierte Blüten ohne Petalen gebildet, die ausnahmslos infertil waren.

Die Tatsache, daß die Wuchsstörungen stets in Kreuzungen mit **E.watsonii** (Ausnahme: **E.watsonii x E.montanum**) auftreten, legt nahe, daß Genom oder Plasmon dieser Spezies an der Verursachung der Wuchsstörungen beteiligt sind. Da die Störungen in den reziproken interspezifischen Bastarden qualitativ oder quantitativ variieren, ist wahrscheinlich das Plasmon an ihrer Ausprägung beteiligt. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, daß das Ausmaß der Störung immer dann am größten ist, wenn **E.watsonii** Mutter war, d.h. wenn vornehmlich das watsonii-Plasmon an die Nachkommen weitergegeben wurde. Die Beobachtung, daß sich die Wuchsstörungen in einigen Fällen im Verlauf der Ontogenie auswachsen, d.h. eine Renormalisierung im Apikalbereich der Pflanze auftritt, ist ebenfalls ein Hinweis auf ein plasmatisch bedingtes Phänomen (Abb. 3a,4). Durch ungleiche Verteilung plasmatischer Konstituenten auf die Tochterzellen können bei einer Folge von Zellteilungen schließlich normale Zellen entstehen. Beruht das Verschwinden von Wuchsstörungen auf der Entmischung plasmatischer Erbträger, so müßten Stecklinge, die aus wuchsgestörten bzw. normalwüchsigen Zonen der Pflanze gemacht werden, den Wuchstyp der jeweiligen Zone aufweisen. Ein entsprechendes Experiment mit wuchsgestörten Bastarden von **E.parviflorum x E.watsonii**, deren Apikalzone normalisiert war, ergab folgendes Resultat:

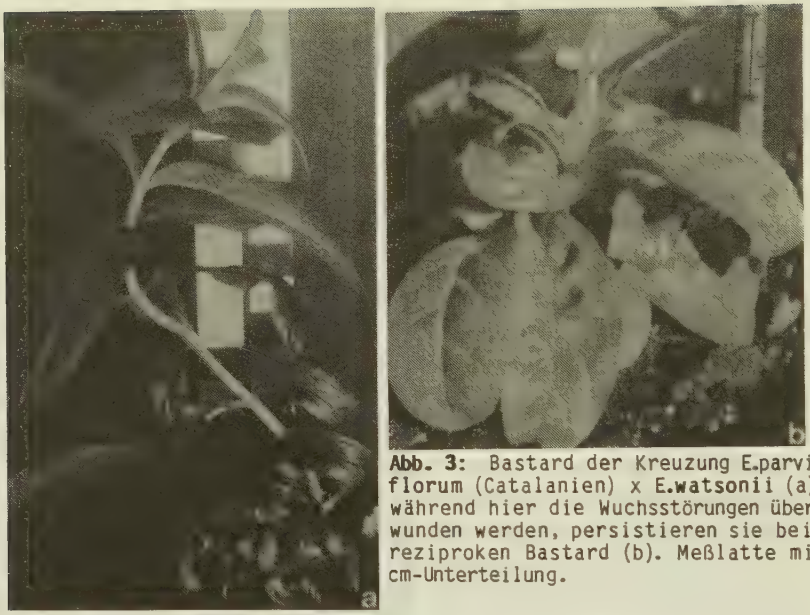


Abb. 3: Bastard der Kreuzung E.parviflorum (Catalanien) x E.**watsonii** (a); während hier die Wuchsstörungen überwunden werden, persistieren sie beim reziproken Bastard (b). Meßlatte mit cm-Unterteilung.

Abb. 4: Zahlreiche renormalisierte Seitentriebe, die an einem E.hirsutum (Siena) x E.**watsonii**-Bastard gebildet werden. Balken: 1 cm.

Triebe aus normalisierter Zone: normalwüchsig

Triebe aus wuchsgestörter Zone: wuchsgestört mit beschleunigter Renormalisierung

Daß wuchsgestörte Teile wachstumsgehemmter Pflanzen mit normalisierter Apikalzone schneller renormalisiert werden, wenn man sie als Stecklinge heranzieht, ist mit der erhöhten Zellteilungsaktivität in den entstehenden Seitentrieben und der damit einhergehenden beschleunigten Entmischung plasmatischer Faktoren erklärbar.

Bei der Beurteilung der Bedingungen, die zu Wuchsstörungen bei interspezifischen Bastarden führen, darf man allerdings nicht das Plasmon isoliert betrachten. Wären die Wuchsstörungen allein vom **watsonii**-Plasmon bedingt, so sollte man erwarten, daß sie in allen interspezifischen Kreuzungen etwa das gleiche Ausmaß haben. In der Kreuzung mit E.**montanum** bleiben sie aber ganz aus, während sie in der Kreuzung mit E.hirsutum extrem stark sind. Zwischen dem watsonii-Plasmon und dem Genom von E.**hirsutum**, **parviflorum** und **lanceolatum** besteht offenbar eine Inkompatibilität unterschiedlichen Ausmaßes.

Die Resultate von Rückkreuzungen mit wuchsgestörten Pflanzen, die zur Blüte kamen, deuten ebenfalls auf die Beteiligung plasmatischer Faktoren an der Auslösung der Wuchsstörungen hin. Bei den Rückkreuzungsbastarden sind die Wuchsstörungen abgeschwächt oder ganz verschwunden. Die Abnahme der Wuchsstörungen steht wahrscheinlich mit der Tatsache in Zusammenhang, daß wuchsgestörte Pflanzen, die zur Blüte kommen, im floralen Bereich stets weitgehend renormalisiert sind, denn hier ist aufgrund der hohen Zahl von Zellteilungsgenerationen[5)] die Entmischung plasmatischer Erbträger am weitesten fortgeschritten.

Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Filialgenerationen reziproker Rückkreuzungen von E.**watsonii**-Bastarden nicht festgestellt werden. Die Anzahl wuchsgestörter Pflanzen und das Ausmaß der Wuchsstörungen ist in den reziproken Rückkreuzungsbastarden etwa gleich groß. Eine Aufspaltung normaler und wuchsgestörter Pflanzen im Verhältnis 1:1, die bei der Verursachung der Wuchsstörungen durch einen kerncodierten Faktor zu erwarten gewesen wäre, trat in keiner

---

5) Begriff von P. Michaelis (1950,1955), der hervorheben soll, daß für plasmatische Erbträger jeder Zellteilungszyklus als Generation zu betrachten ist, da mit ihm die Neukombination plasmatischer Erbträger einhergeht.

der drei Rückkreuzungen mit E.watsonii-Bastarden auf. Zudem führte die Rückkreuzung von E.(hirsutum x watsonii) mit E.watsonii zu der gleichen Anzahl wuchsgestörter Nachkommen wie die Rückkreuzung von E.(hirsutum x watsonii) mit E.hirsutum. Wäre ein mendelnder Erbfaktor von E.watsonii für die Ausprägung der Wuchsstörungen verantwortlich, so wäre in der Rückkreuzung mit E.watsonii eine höhere Zahl wuchsgestörter Nachkommen zu erwarten gewesen als in derjenigen mit E.hirsutum.

Auch in der Rückkreuzung von E.(parviflorum x watsonii) mit E.watsonii war die Anzahl wuchsgestörter Pflanzen etwa genauso hoch wie in der Kreuzung von E.(parviflorum x watsonii) mit E.parviflorum. Das gleiche gilt für die Nachkommenschaften der Rückkreuzungen des E.(lanceolatum x watsonii)-Bastards.

Die Rückkreuzungen der reziprok verschiedenen Bastarde von E.hirsutum(Cordoba) und E.parviflorum (Berlin)-Kreuzungen führten zu keinen signifikanten Reziprokenunterschieden. Demzufolge sind keine rein maternal vererbte plasmatische Faktoren für die Ausprägung der Reziprokenunterschiede verantwortlich, da sonst ein ähnlicher Reziprokenunterschied zwischen den Rückkreuzungsbastarden E.(parviflorum x hirsutum) x E.hirsutum und E.hirsutum x E.(parviflorum x hirsutum) wie zwischen E.(hirsutum x parviflorum) und E.(parviflorum x hirsutum) zu erwarten wäre.

Der E.(parviflorum x montanum)-Bastard, der sich von seinem reziproken Bastard nur bezüglich der Pollenfertilität unterscheidet, führte in der Rückkreuzung mit E.montanum wieder zu einer pollensterilen Nachkommenschaft. Der Bastard E.(parviflorum x montanum) x E.montanum unterschied sich von E.(parviflorum x montanum) x parviflorum-Nachkommen nicht nur bezüglich der Pollenfertilität, sondern auch bezüglich der Fertilität des weiblichen Gametophyten und der Verzweigung der Sproßachse. Er war in beiden Geschlechtern steril und hatte eine stark verzweigte Sproßachse mit außergewöhnlich intensiv geförderten Seitentrieben.

Die Verstärkung der Fertilitätsstörungen bei der Rückkreuzung mit E.montanum deutet auf einen maternal vererbten plasmatischen Faktor des E.parviflorum-Plasmons hin, der offenbar mit dem Genom von

E.montanum nicht kompatibel ist. Wie noch in der Diskussion zu erörtern sein wird, ist die Verursachung der Wuchsstörungen nicht allein durch einen maternal vererbten plasmatischen Faktor erklärbar, da sonst die reziproken Ruckkreuzungen unterschiedliche Nachkommenschaften hervorbringen müßten.

Während bei Oenothera Hinweise auf das Vorkommen verschiedener Plastome aus der phanotypischen Analyse interspezifischer Kreuzungen abgeleitet werden können, ist dies bei Epilobium nicht möglich. Eine in Form von Chlorophylldefekten phänotypisch sichtbare Störung der Interaktion von Genom und Plastom, auf deren Basis die Unterscheidung verschiedener Plastome bei Oenothera gelang (Stubbe, 1959), wurde weder in den vorliegenden Kreuzungen, noch in früheren kreuzungsgenetischen Arbeiten mit Epilobium (Renner & Kupper 1921; Geith 1923; Michaelis 1950, 1951, 1958, 1961; Seavey & Raven 1977a, 1977b, 1978) gefunden. Dagegen bestehen Hinweise auf Disharmonien zwischen anderen plasmatischen Erbträgern und nukleären Faktoren in wuchsgestörten interspezifischen Bastarden.

3.2 Analyse des Plastidenerbgangs in Kreuzungsexperimenten mit grün/weiß gescheckten Pflanzen

Die Durchführung von Kreuzungen mit Pflanzen, die phänotypisch unterscheidbare Plastiden enthalten, diente der Überprüfung der Frage, ob Plastiden bei Epilobium im Kreuzungsexperiment einen rein maternalen Plastidenerbgang zeigen, wie von P. Michaelis (1958) beschrieben.

Als Ausgangsmaterial dienten Schecken von E.hirsutum(Siena), die auf rein weißen Seitenzweigen fertile Blüten trugen (Abb. 5). So ließ sich mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Prämisse ausgehen, daß die Gameten aus diesen Blüten ausschließlich mutierte Plastiden enthalten. Zur Überprüfung der Prämisse wurde eine Selbstung der Schecke auf

Abb. 5: Weiß-grün gescheckte Pflanze von E.hirsutum (Siena), die einzelne rein weiße Seitentriebe gebildet hat. Meßlatte mit cm-Unterteilung.

ihren weißen Seitentrieben vorgenommen. Vergleichend wurden Kreuzungen mit Gameten aus Blüten gescheckter Seitenzweige durchgeführt. Die Ergebnisse der reziprok angesetzten Kreuzungen zwischen E.**hirsutum**-Pflanzen mit grünem und weißem Plastidom (Dangeard, 1919: morphologische Gesamtheit der Plastiden) und E.**luteum**-Pflanzen mit grünem Plastidom sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3:

Ergebnisse der Kreuzungen mit Blüten von grünen (g), gescheckten (g/w) und weißen (w) Seitenzweigen von E.hirsutum (hirs) bzw. luteum (lut) Pflanzen

Parental-Typ F_1	hirs g x w	hirs g/w x g	hirs w x w	hirs w x g	hirs w x lut g
Keimungsrate %	89	80	71	67	69
Zahl d. Nachkommen	1048	604	578	403	216
grüne Nachkommen	1045	184	0	5	0
%	99,7	30,5	0	1,2	0
gesch. Nachkommen	0	14	0	0	0
%	0	2,3	0	0	0
Nachkommen mit gesch.Primärblättern	3	39	0	0	0
%	0,3	6,4	0	0	0
weiße Nachkommen	0	367	578	398	216
%	0	60,8	100	98,8	100

In der Kreuzung E.hirsutum(g) x E.hirsutum(w) traten nur Nachkommen auf, die phänotypisch das Plastidom der mutterlichen Pflanzen zeigten. Die drei Primärblattschecken dieser Kreuzung hatten gelbgrüne Blätter, deren Plastidenphänotyp nicht dem des männlichen Elters entsprach und die bald voll ergrünten. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Phänomen um eine entwicklungsphysiologische Störung. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß das partielle Ergrünen der Primärblätter

durch wenige mutierte paternale Plastiden bedingt ist, die frühzeitig von grünen Plastiden verdrängt werden.

Das Ergebnis der Kreuzung **E.hirsutum(w)** x E.hirsutum(g) stützt die Hypothese, daß in seltenen Fällen paternale Plastiden in die Eizelle gelangen können, denn in 1,2% der Fälle hatten die Nachkommen grüne Plastiden, d.h. Plastiden, die phänotypisch denen des männlichen Elters entsprachen. Unklar ist bei dem Ergebnis dieser Kreuzung, die in verschiedenen Vegetationsperioden an insgesamt vier Blüten durchgeführt werden konnte[6], weshalb keine gescheckten Nachkommen auftraten. Zwar wäre es denkbar, daß unter den weißen Nachkommen einige Schecken waren, die so wenige grüne Plastiden enthielten, daß sie phänotypisch unerkannt blieben und durch das frühzeitige Absterben der Pflanzen keine weitere Chance zur Vermehrung hatten. Für die grünen Pflanzen müßte man entsprechend eine frühe zahlenmäßige Überlegenheit der grünen Plastiden annehmen, die eine Verdrängung weißer Plastiden nach sich zieht.

Eine weitere Erklärung wäre der Einwand, daß möglicherweise einige Eizellen der Blüten weißer Seitentriebe noch ergrünungsfähige Proplastiden enthielten. Gegen diese Erklärung sprechen die Ergebnisse der Kreuzung **E.hirsutum(w) x E.hirsutum(w)**.

Die Kreuzung E.hirsutum(w) x E.luteum(g) wurde durchgeführt, nachdem sich zeigte, daß die Plastome von **E.hirsutum** und **E.luteum** molekulargenetisch unterscheidbar sind. Die Plastiden grüner Nachkommen dieser Kreuzung wären damit eindeutig als maternal oder paternal vererbt identifizierbar gewesen. Leider traten in der Filialgeneration keine grünen Pflanzen auf.

Die Kreuzung E.hirsutum(g/w) x E.hirsutum(g), bei der Narben von gescheckten Seitenzweigen mit Pollen von normalgrünen Pflanzen bestäubt wurden, hatte erwartungsgemäß eine Nachkommenschaft mit allen drei möglichen Plastidentypen (grüne, gescheckte, und weiße Pflanzen). Auffällig war die relativ geringe Anzahl vollständig gescheckter Nachkommen (2,3%) und die fast dreimal höhere Zahl von Pflanzen, die nur in frühen Stadien gescheckt waren (Primärblattschecken). Es ist anzu-

---

[6] Das Auftreten rein weißer Seitentriebe, die Blüten tragen, ist bei den verwendeten Schecken ein sehr seltenes Ereignis, das im Verlauf der Experimente nur an insgesamt zwei Pflanzen auftrat (s. Abb. 5).

nehmen, daß die gescheckten Pflanzen von Eizellen mit gemischtem Plastidom abstammen. Der weibliche Gametophyt, der die Eizellen bildet, entsteht innerhalb der Samenanlagen aus der zweiten Tunicaschicht des Vegetationskegels. Wenn die Initialzellen der zweiten Tunikaschicht Mischzellen sind, können das Archespor, die Megasporen und der daraus gebildete weibliche Gametophyt ebenfalls zwei Plastidensorten enthalten. Obwohl bei jeder Zellteilung die Entmischung weiter voranschreitet, wird ein Teil der Eizellen derartiger Blüten von gescheckten Zweigen bezüglich ihres Plastidoms mischerbig sein.

Aussagen über die Geschwindigkeit, mit der grüne und weiße Plastiden segregieren bzw. mit der weiße Plastiden von grünen verdrängt werden können, lassen sich anhand dieser Kreuzung jedoch nicht machen, da dazu das exakte Ausgangsverhältnis normaler und mutierter Plastiden in den Eizellen bekannt sein müßte.

3.3 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER WEITERGABE PLASMATISCHER ERBTRÄGER

Der den vorangehenden Kreuzungsexperimenten zufolge überwiegend maternale Plastidenerbgang von **Epilobium** wirft die Frage nach den zugrundeliegenden Ursachen bzw. nach dem Schicksal der väterlichen Plastiden auf. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Spermatogenese kann zu einer Lösung dieses Fragenkomplexes beitragen, denn Plastiden und Mitochondrien eines Elters sind nur dann potentiell vererbbar, wenn sie in den Gameten des betreffenden Elters vorhanden sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der männlichen Gametophyten höherer Pflanzen haben gezeigt, daß Organellen auf verschiedenen Stufen der Mikrogametophyten-Entwicklung eliminiert werden können. Bei vielen Angiospermen wird das väterliche Plastidom bereits bei der Teilung der Mikrospore in die vegetative und generative Zelle aus der Keimbahn eliminiert (Hagemann, 1979; Sears, 1980).

3.3.1 Analyse des männlichen Gametophyten

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Schmitz, 1979) haben gezeigt, daß die generative Zelle von **E.hirsutum** Plastiden und Mitochondrien enthält. Die Präsenz dieser Organellen in der generativen Zelle gibt aber noch keine Gewähr für ihre Beteiligung an der Konstitution des Plasmons der Nachkommenschaft. Daher wurden die Spermazellen, die mitotisch aus der generativen Zelle hervorgehen und als Gameten fungieren, elektronenmikroskopisch untersucht.

3.3.2 Ultrastruktur der Spermazellen von Epilobium

Während geißelbewegliche Gameten pflanzlicher oder tierischer Organismen relativ leicht präparierbar und elekronenmikroskopisch analysierbar sind, sind die Spermazellen der Angiospermen mit binukleärem Pollen für ultrastrukturelle Untersuchungen schwer zugänglich. Bei

Epilobium befinden sich die Spermazellen in der Nähe der Spitzenregion von Pollenschläuchen, die den Griffel durchwachsen; bei im Narbengewebe befindlichen oder in vitro gekeimten Pollenschläuchen sind sie dagegen nicht vorhanden (Schmitz, 1979). Um nicht den gesamten Griffel (ca. 1 cm lang) nach den weniger als 10 µm langen Spermazellen absuchen zu müssen, wurde das in 2.2.1 beschriebene Verfahren zur schnellen Ortung der Spermazellen im Griffel entwickelt.

Ultradünne Serienschnitte der Spermazellen von Epilobium zeigen, daß eine der beiden Spermazellen jeweils etwa ein Drittel größer ist als die andere, d.h. die Teilung der generativen Zelle erfolgt inäqual (s. Abb. 8). Dieses Phänomen wurde auch von Russell (1981) bei **Plumbago** beobachtet und steht im Gegensatz zu Untersuchungen bei **Gossypium** (Jensen, 1968) und **Hordeum** (Cass, 1973). Neben zahlreichen Mitochondrien enthalten die Spermazellen von Epilobium endoplasmatisches Retikulum, wenige Dictyosomen, aber keine Plastiden. Wie Abb. 6 zeigt, lassen sich in der generativen Zelle Proplastiden trotz ihrer einfachen Organisation durch spezifische Merkmale gut identifizieren. Sie enthalten kaum Endomembranen, wohingegen diese in den Mitochondrien der generativen Zelle und der Spermazellen zahlreich sind. Zudem sind die Mitochondrien nur etwa halb so groß wie die Proplastiden und haben im Gegensatz zu diesen eine uneinheitlich dichte Matrix mit amorphen Granula.

Die Degeneration der Plastiden erfolgt wahrscheinlich unmittelbar nach der Teilung der generativen Zelle, denn nur in einem Fall konnten in einer Spermazelle noch intakte Proplastiden nachgewiesen werden. Häufiger findet man dagegen degenerierende Plastiden bzw. Verdauungsvakuolen, in denen die Plastiden aufgelöst werden (s. Abb 7).

Die Plastiden der vegetativen Zelle des männlichen Gametophyten werden nicht abgebaut, d.h., die Plastidendegeneration bleibt auf die Gameten beschränkt.

Zur Frage nach dem Mechanismus der Eliminierung paternaler Plastiden in den Spermazellen kann bisher lediglich angenommen werden, daß lytische Enzyme, die in Verdauungsvakuolen produziert werden, beim Abbau der Plastiden eine Rolle spielen. Die Abbauprozesse betreffen spezifisch die Plastiden, denn die Mitochondrien persistieren in den

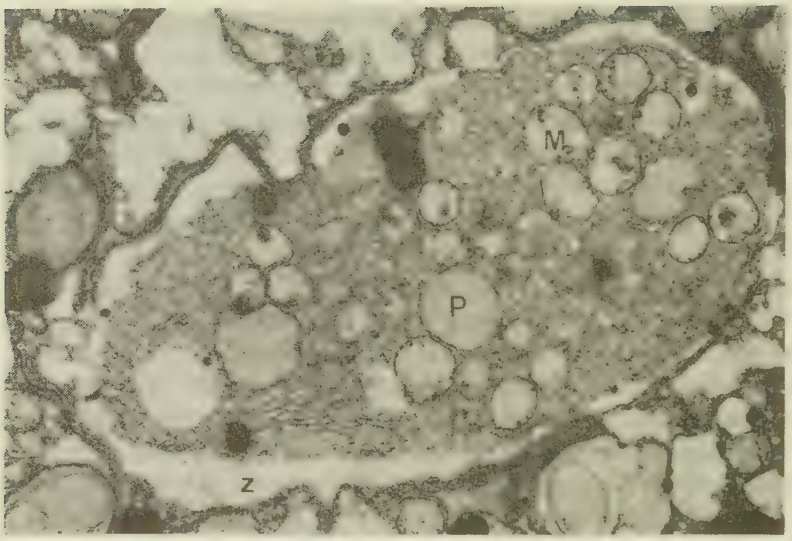


Abb. 6: Ultradünnschnitt durch die generative Zelle im Pollenschlauch von E.**parviflorum** - Mitochondrium (M), Proplastide (P), Zellwandsubstanz der generativen Zelle (Z); x 26000

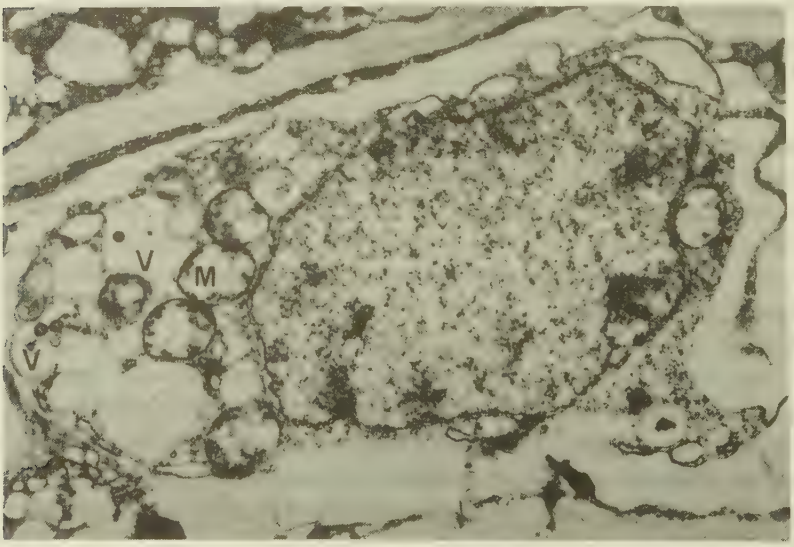


Abb. 7: Spermazelle von E.**hirsutum** mit intakten Mitochondrien (M) und in Verdauungsvakuolen (V) aufgelösten Proplastiden; x 28000

Spermazellen von Epilobium (Abb. 8) und sind insofern potentiell biparental vererbbar. Die Frage nach der Genauigkeit, mit der der Mechanismus zur Eliminierung paternaler Plastiden arbeitet, wird in 3.4.4.2 untersucht.

Abb. 8: Medianer Längsschnitt durch die beiden Spermazellen im Pollenschlauch von **E.hirsutum** innerhalb des Griffelgewebes. Die untere Spermazelle ist zur Pollenschlauchspitze orientiert. Mitochondrien (M), Zellkern (N), Vakuole (V); x 9000

3.4 PLASTOME DER GATTUNG EPILOBIUM UND IHRE VERERBUNG IN INTERSPEZIFISCHEN KREUZUNGEN

Wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt wurde, lassen sich Form und Zeitpunkt der Eliminierung paternaler Plastiden in den Gameten von Epilobium durch elektronenmikroskopische Untersuchungen klären. Ob und in welchem Umfang paternale Plastiden in den Spermazellen persistieren und in die Eizelle gelangen können, läßt sich durch diese Untersuchungen allerdings kaum festellen, da die technisch komplizierte und für die statistische Auswertung extrem zeitaufwendige Herstellung und Auswertung von Schnittserien der Spermazellen zum limitierenden Faktor einer solchen Untersuchung würde. Zudem bleibt bei der Untersuchung der Ultrastruktur einzelner Phasen aus der Gesamtentwicklung des väterlichen Plasmas von der Meiocyte bis zur Gametenbildung und Befruchtung stets die Ungewißheit, ob nicht in der nächsten Entwicklungsphase doch noch wesentliche Veränderungen bezüglich der plasmatischen Erbträger eintreten. Eine Eliminierung plasmatischer Erbträger eines Elters kann z.B. ohne weiteres auch erst im Verlauf der ersten Zygotenteilungen eintreten (Stubbe et al., 1978).

Die Kombination von Kreuzungsexperimenten mit einer molekulargenetischen Analyse der Plastiden der Nachkommenschaft ermöglicht demgegenüber eine klare Aussage über die Anzahl paternaler Plastiden, die als intakte Erbträger in der Nachkommenschaft vorliegen. Da eine solche Analyse als Unterscheidungskriterium der elterlichen Plastiden nicht mehr deren Farbe, sondern die Beschaffenheit der ptDNA heranzieht, kann man Kreuzungspartner mit normalgrünen Plastiden verwenden und damit einen Einfluß auf die Teilungsaktivität, wie er bei mutierten Plastiden nie auszuschließen ist, vermeiden.

Um den Plastidenerbgang molekulargenetisch analysieren zu können, ist es zunächst notwendig, artspezifische Marker der ptDNAs von zwei miteinander kreuzbaren Arten zu finden. Als Marker der im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche wurden die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen gewählt, deren Anzahl auf den ptDNAs verschiedener Spezies oft unterschiedlich ist. Die Herkunft der Plastiden der Nachkommenschaft läßt sich damit anhand der spezifischen Fragmentmuster

ihrer DNAs bestimmen.

Die molekulargenetische Analyse der Plastidenvererbung bietet einen weiteren Vorteil: Durch die Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme lassen sich mehrere Plastome charakterisieren, so daß ein breites Spektrum von Kreuzungen analysierbar wird und damit nicht mehr vom Einzelfall einer bestimmten Kreuzung auf eine allgemeine Aussage extrapoliert werden muß.

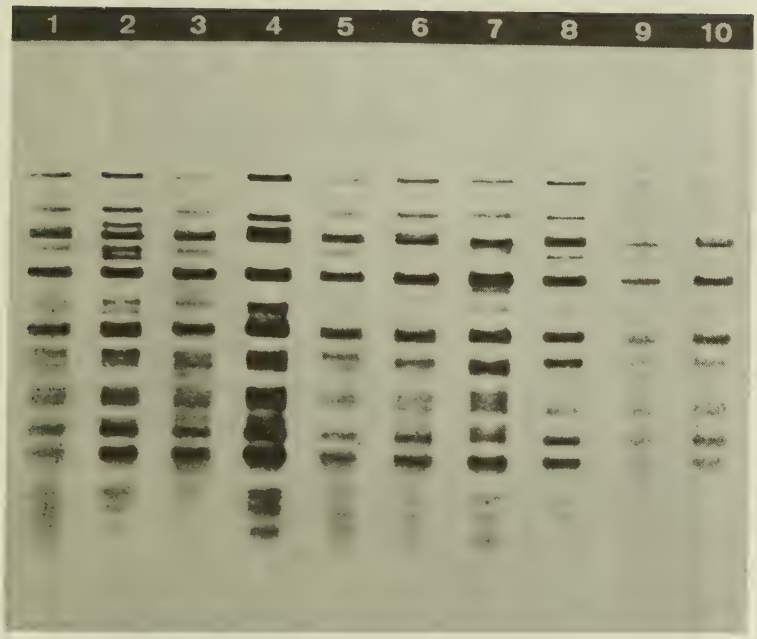
Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Untersuchung der Plastomvarianz und Plastomorganisation bei mehreren **Epilobium**-Arten schuf die Voraussetzungen für die Untersuchung der Frage, ob bei Epilobium ein Zusammenhang zwischen der Plastomorganisation und dem Modus der Plastidenvererbung, wie er bei Oenothera beschrieben wurde (Stubbe, 1959), besteht.

3.4.1 Plastomvarianz bei zehn verschiedenen Epilobium-Arten

Insgesamt zwölf ptDNAs von zehn Arten aus vier Erdteilen wurden molekulargenetisch charakterisiert. Um den Grad der Ähnlichkeit und damit die verwandtschaftliche Distanz einzelner Plastome möglichst genau erfassen zu können, wurden die ptDNAs mit sieben Restriktionsendonukleasen (Bam HI, Bgl I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Pvu II und Sal I) verdaut, die zusammen über 170 Schnittstellen auf der ptDNA erkennen.

Eine intraspezifische Plastomvarianz tritt bei Verwendung der entsprechenden Enzyme zwischen den Sippen E.hirsutum(Cordoba) und E.hirsutum(Siena) sowie den Sippen E.parviflorum(Catalanien) und E.parviflorum(Berlin) nicht auf. Eine interspezifische Plastomvarianz ist dagegen zwischen allen zehn Arten nachweisbar, so daß von zehn verschiedenen Plastomen gesprochen werden muß. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, traten artspezifische Bandenmuster vor allem bei Verwendung häufig schneidender Enzyme (Bam HI, Bgl II, Eco RI) auf. Beim Eco RI-Muster sind zwischen **E.parviflorum** und **E.luteum** über zehn Banden verschieden und bei keiner der untersuchten Arten tritt ein identisches Eco RI-Schnittmuster auf. Für das Enzym Sal I kommen dagegen bei allen zehn Arten insgesamt nur zwei Schnittmustertypen vor, d.h. Position

Abb. 9



c

Abb. 9: Pherogramm (0,7%iges Agarosegel) der ptDNAs aller zehn untersuchten **Epilobium**-Arten nach Verdauung mit den Enzymen Bam HI (a), Bgl II (b) und Eco RI (c). Bahn 1 bis 10 zeigen die Fragmentmuster der ptDNAs von E.hirsutum (1), E.parviflorum (2), E.montanum (3), E.watsonii (4), E.lanceolatum (5), E.luteum (6), E.billardierianum (7), E.duriaei (8), E.coloratum (9), E.glandulosum (10).

und Anzahl sämtlicher Sal I-Erkennungssequenzen sind, außer bei E.watsonii und E.billardierianum, konserviert. Wie Tabelle 4 zeigt, treten auch bei Verwendung des Enzyms Bgl I nur zwei Schnittmustertypen auf (s. Abb. 10).

Tabelle 4

Größe und Anzahl von Fragmenten der ptDNAs verschiedener Epilobium-Arten nach Verdauung mit den Restriktionsenzymen Bgl I, Pvu II und Sal I.

*Die vollständigen Artnamen sind dem Verzeichnis der Abkürzungen zu entnehmen.

Restriktionsenzym	Bgl I		Sal I		Pvu II			
Epilobium-Arten*	bill., col., dur., glan., hirs., lanc., parv., wat.	mont., lut.	col., dur., glan., hirs., lanc., lut., mont., parv.	bill., wat.	col., dur., glan., hirs., lanc., parv.	mont.	bill., wat.	lut.
Fragmentgrößen (kbp)	B1 44	44	S1 46	46	P 1 24,3	18,8	24,3	24,3
	B2 31,5	31,5	S2 24	36	P 2 18,8	18,6	18,8	18,8
	B3 29,5	29,5	S3 22,5	22,5	P 3 18,6	17,7	18,6	18,6
	B4 18,6	22,5	S4 17	17	P 4 17,7	15,7	17,7	17,7
	B5 13,7	18,6	S5 12,3	11,6	P 5 14	14	14	14
	B6 8,8	4,6(2x)	S6 11,6	11	P 6 11,5	11,5	11,5	11,3
	B7 4,6(2x)		S7 11	9,2	P 7 9,8	9,8	9,8	10
			S8 9,2	1,9	P 8 8,8	8,8	9,7	8,8
			S9 1,9		P 9 7,3	8,6	7,3	7,3
					P10 4 (2x)	7,3	4 (2x)	4 (2x)
					P11 3,9(2x)	4 (2x)	3,9(2x)	3,9(2x)
					P12 3,2	3,9(2x)	3,2	3,2
					P13 2,7(2x)	3,2	2,7(2x)	2,7(2x)
					P14 0,9	2,7(2x)		0,9
					P15	0,9		
Summe	155,3	155,3	155,5	155,2	156,1	156,1	156,1	156,1

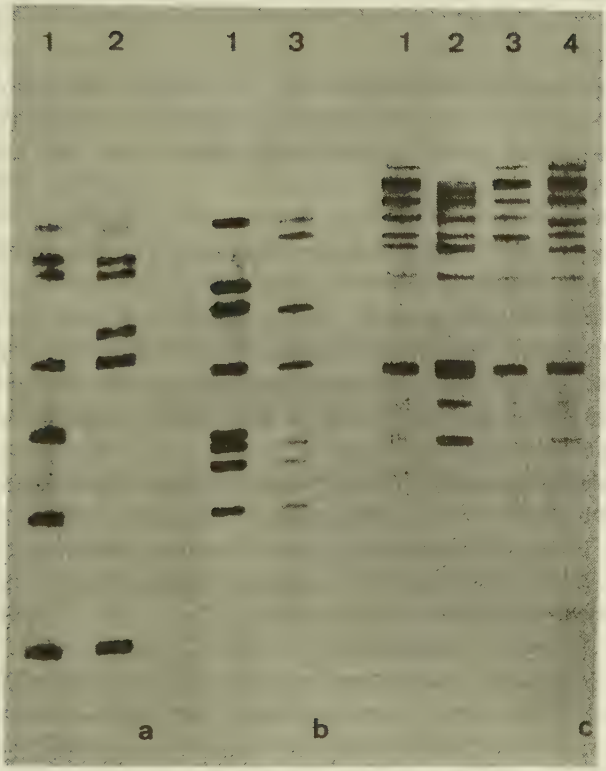


Abb. 10: Pherogramm der ptDNA von E.lanceolatum (Bahn 1), E.montanum (Bahn 2), E.watsonii (Bahn 3) und E.luteum (Bahn 4) nach Verdauung mit den Enzymen Bgl I (a, 0,4%iges Agarosegel), Sal I (b, 0,4%iges Agarosegel) und Pvu II (c, 0,7%iges Agarosegel).

Die Verdauung mit Pvu II, das auf der Epilobium ptDNA 4-6 Schnittstellen mehr als Sal I erkennt, führt zu vier Schnittmustertypen (s. Abb. 10). Die Schnittmusterunterschiede kommen sowohl durch Auftreten bzw. Fehlen einzelner Fragmente zustande, als auch durch geringfügige Änderungen ihrer elektrophoretischen Mobilität. Letztere treten z.B. bei den Pvu II-Fragmenten 6 und 7 von E.luteum im Vergleich zu den

betreffenden Fragmenten aller anderen Arten auf. Die Position einiger Schnittmusterunterschiede auf der zirkulären ptDNA wird in 3.4.4.2 analysiert.

Die Bestimmung der Molekulargewichte aller ptDNA-Fragmente, die von den sieben eingesetzten Enzymen bei den untersuchten **Epilobium**-Arten erzeugt werden, ermöglicht einen exakten Vergleich der zehn Plastome. Dieser Vergleich bezieht sich allerdings nur auf die Schnittstellen der verwendeten Enzyme bzw. ihre relative Lage zueinander. Mutative Veränderungen der ptDNA (z.B. Deletionen, Insertionen, Inversionen oder Basenmodifikationen innerhalb von Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen) führen zur Entstehung von Fragmenten mit verändertem Molekulargewicht, d.h., die Häufigkeit von Fragmentgrößenänderungen zwischen zwei Plastomen kann als Maß ihrer Ähnlichkeit dienen. Dabei wird vorausgesetzt, daß Fragmente identischer Größe die gleiche Position auf der ptDNA haben und insofern als übereinstimmendes Merkmal der verglichenen Plastome gelten können. Dieser Prämisse kommt aufgrund der starken Übereinstimmung der untersuchten Plastome (s. auch 3.4.2 - 3.4.3) ein hoher Wahrscheinlichkeitsgrad zu.

Der Vergleich aller durch ein bestimmtes Enzym erzeugten Fragmentgrößen eines Plastoms mit den Fragmenten, die das betreffende Enzym bei allen anderen Plastomen erzeugt, wurde mit Hilfe eines Computer-Programms für alle sieben Enzyme durchgeführt. Um Aussagen über die Ähnlichkeit von Plastomen machen zu können, bei denen ein bestimmtes Enzym eine unterschiedliche Zahl von Fragmenten erzeugt, wurde die Formel

$$S_{i,j} = \frac{2\ G_{i,j}{}^{*}}{A_i + A_j}$$

zur Berechnung des Ähnlichkeits-Koeffizienten ($S_{i,j}$) verwendet. Entsprechend der Anzahl identischer Fragmentgrößen zwischen den Plastomen i und j nimmt der Ähnlichkeits-Koeffizient Werte zwischen 0 und 1 an.

---

*$G_{i,j}$ = gemeinsame Fragmente der Plastome i und j
A_i = Anzahl der Fragmente von Plastom i
A_j = Anzahl der Fragmente von Plastom j (vgl. Ehrendorfer, 1983)

Die Ähnlichkeits-Koeffizienten wurden sowohl für die Fragmente jedes einzelnen Enzyms, als auch für Fragmente aller Enzyme berechnet und in Form einer Matrix aufgetragen. Mit Hilfe eines weiteren Computer-Programms[7] wurden die Werte der Matrix in eine graphische Darstellung umgesetzt, in der die Ähnlichkeit zweier Plastome anhand der Höhe der horizontalen Linien, die die betreffenden Plastome verbinden, ablesbar ist.

Abb. 11 zeigt die Auswertung der Ähnlichkeits-Koeffizienten, die sich aus dem Vergleich aller molekulargewichtsmäßig erfaßten Fragmente der zehn analysierten Plastome ergeben. Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist der Grad der mutativen Veränderung von Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme bei den untersuchten Plastomen verschieden. So sind die Plastome der nordamerikanischen Arten E.**coloratum** (48) und E.glandulosum (49) bzgl. der betrachteten Fragmente fast identisch. Sie haben einen Ähnlichkeits-Koeffizienten, der größer als 0,98 ist. Dagegen sind die Plastome der eurasischen Arten E.parviflorum (8), E.lanceolatum (14), E.**duriaei** (43) und E.**montanum** (10) mit den Plastomen der übrigen sechs Arten nur durch einen Koeffizienten von 0,79 korreliert. Zu diesen sechs Arten gehören vorwiegend nordamerikanische Vertreter (11, 24, 48, 49) sowie die neuseeländische Art E.billardierianum (31) und eine eurasische Art (E.**hirsutum**, 2).

Wie in Abschnitt 4.1 erörtert, soll das Schema primär Aussagen über die Ähnlichkeit der Plastome verschiedener E**pilobium**-Arten machen und nicht als phylogenetisches Schema verstanden werden.

---

[7] Für die Erstellung der Computerprogramme danke ich Herrn Dr. O. Wasmund.

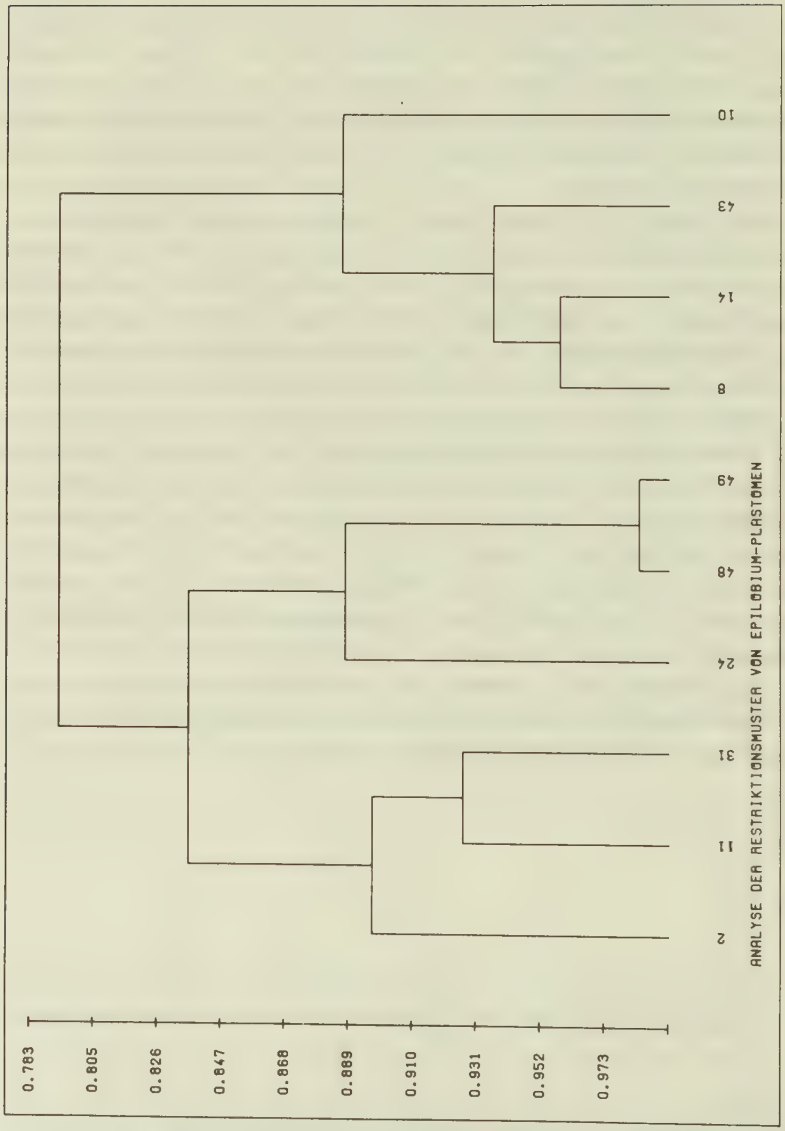

ANALYSE DER RESTRIKTIONSMUSTER VON EPILOBIUM-PLASTOMEN
2
11
31
24
48
49
8
14
43
10
0.783
0.805
0.826
0.847
0.868
0.889
0.910
0.931
0.952
0.973

Abb. 11

Abb. 11: Ähnlichkeitsdiagramm der zehn untersuchten Epilobium-Plastome. Für die computergestützte Erstellung des Diagramms wurden alle molekulargewichtsmäßig erfaßten Fragmente herangezogen, die bei Verdauung der ptDNAs mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Bgl I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Pvu II und Sal I entstehen. Die Zahlen unterhalb der senkrechten Linien geben die Spezies an, deren ptDNA untersucht wurde (Zahlencode s. Tab. 1). Je geringer die Übereinstimmungen zweier Plastome bzgl. der Position der Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme sind, desto kleiner ist der auf der Ordinate angegebene Ähnlichkeitskoeffizient.

3.4.2 Erstellung von physikalischen Karten einiger Epilobium-Plastome

Die physikalische Kartierung der ptDNA, d.h. die Bestimmung der seriellen Anordnung der durch ein bestimmtes Enzym erzeugten DNA-Fragmente, ist für eine detaillierte Plastomanalyse unverzichtbar. Sie schafft sowohl die Voraussetzungen für eine Lokalisierung von Schnittmusterunterschieden, als auch für eine Kartierung plastidärer Gene. Damit ist sie Grundlage der Erfassung molekularer Veränderungen und Rearrangements des Plastidengenoms, wie auch der Untersuchung seines evolutiven Werdegangs in Gattungen und Familien.

Zur Lokalisierung der Schnittstellen einzelner Enzyme auf der ptDNA wurde in erster Linie die von Lawn et al. (1978) bzw. Herrmann et al. (1980c) beschriebene Schmelzverdauungsanalyse angewandt. In Bereichen, wo trotz der Analyse mit drei Enzymkombinationen die Reihenfolge einzelner Fragmente nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden Kreuz-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Fragmenten in die Kartierungsstrategie einbezogen.

Die Schmelzverdauungsanalyse, die auf der Grundlage der Verdauung der ptDNA mit zwei Enzymen und der reziproken Verdauung separierter Fragmente mit den betreffenden Enzymen arbeitet, ist von Herrmann et al. (1980c), Gordon et al. (1981) und Herrmann & Whitfeld (1981) ausführlich erläutert worden. Ohne auf Einzelheiten einzugehen, soll darum nur ihr Grundprinzip genannt werden; dieses besteht in der Annahme, daß Fragment Ax* und Fragment By dann miteinander um den Betrag der Molekülgröße von Subfragment ABz** überlappen, wenn bei der sepa-

---

Ax* Fragment x, das bei Verdauung der DNA mit Enzym A entsteht (entsprechend By)

ABz** Fragment z, das bei Verdauung der DNA mit den Enzymen A und B entsteht

raten Verdauung sowohl von Ax mit Enzym B als auch von By mit Enzym A jeweils Subfragment ABz auftritt.

Für die ptDNAs von E.lanceolatum und E.watsonii wurden zunächst unabhängig voneinander physikalische Karten mit den Enzymkombinationen Bgl I/Pvu II, Bgl I/Sal I und Pvu II/Sal I erstellt. Dafür wurden die Fragmente der Einzelverdauungen der drei Enzyme (s. Tab. 4) in niedrigschmelzender Agarose elektrophoretisch aufgetrennt und jedes isolierte Einzelfragment mit den beiden anderen Enzymen separat nachverdaut. Die dabei entstehenden Subfragmente wurden mit den Subfragmenten der Doppelverdauung der entsprechenden Enzymkombination verglichen. Wie die in Abb. 12 dargestellten Kartierungsgele zeigen, war eine eindeutige Zuordnung der Subfragmente zu den Primärfragmenten möglich.

In Tabelle 5 sind die Größen der Fragmente aller 3 analysierten Doppelverdauungen zusammengestellt. Hinter dem Molekulargewicht jedes Subfragments sind die Primärfragmente aufgeführt, die beim Nachschnitt mit dem zweiten Enzym das betreffende Subfragment hervorbringen.

Die Ergebnisse der Schmelzverdauungsanalyse sind, sofern sie zur Ermittlung der Fragmentanordnung herangezogen wurden, in Tabelle 6 zusammengestellt. Dabei wurden die Fragmente der Einzel- und Doppelverdauungen entsprechend ihrem Molekulargewicht durchnumeriert und mit den Initialen der Restriktionsendonuklease bzw. der Enzymkombination versehen, die zu ihrer Entstehung führt. Die Argumente für die unmittelbare Nachbarschaft zweier Fragmente sind nach folgendem Schema in Form eines "Dreisatzes" zusammengestellt: Wenn Fragment P 7 beim Nachschnitt mit Bgl I die Subfragmente BP 8 und BP 14 erzeugt, und Fragment P 6 bei Zusatz von Bgl I ungeschnitten mit dem Molekulargewicht von BP 5 verbleibt, dann liegen P 6 und P 7 nebeneinander, da ihre Doppelverdauungsfragmente BP 5 und BP 14 beim Nachschnitt des Bgl I-Fragments B 2 mit Pvu II entstehen. Der Argumentation liegt neben der Zuordnung der Subfragmente die Überlegung zugrunde, daß ein Primärfragment, das vom zweiten Enzym nicht nachgeschnitten wird, jeweils ein zentral gelegenes Subfragment sein muß, d.h. BP 5 liegt zwischen BP 3 und BP 14. Die relative Lage von P 7 und P 3 zum Fragment

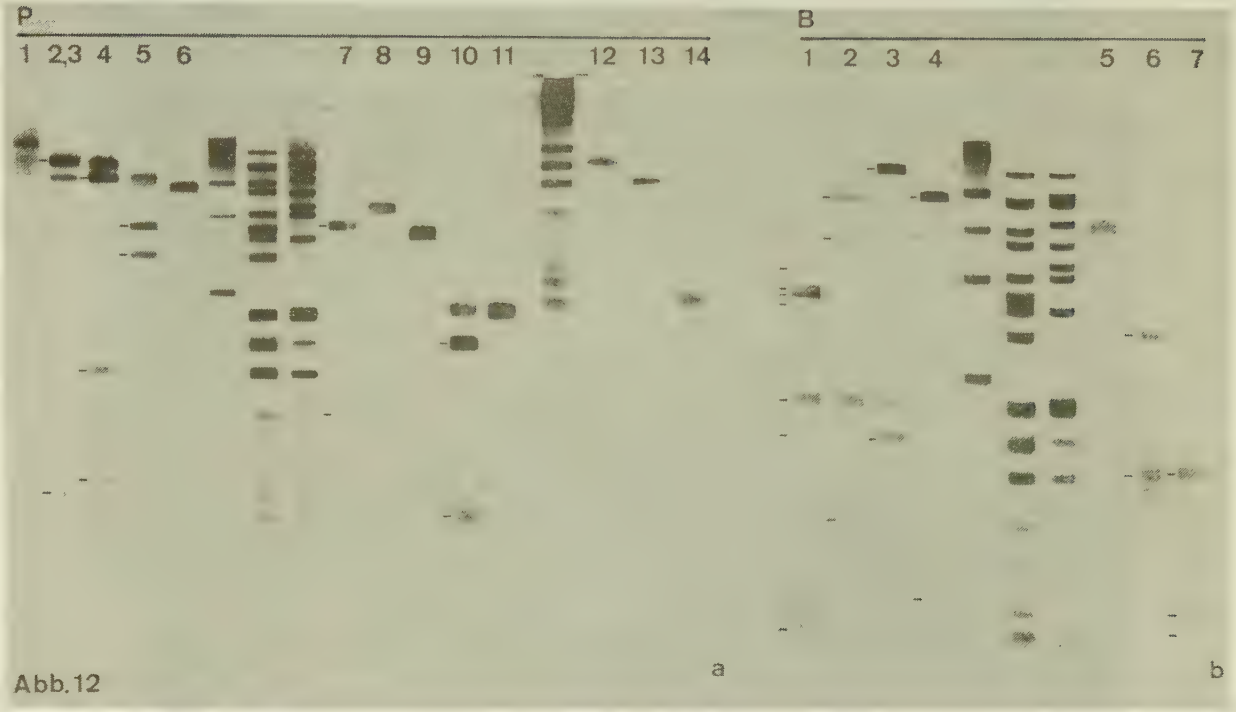


Abb.12

a: Bgl I-Verdauung der Pvu II-Fragmente P 1 bis P 11 auf einem 0,7%igen und der Fragmente P 12 bis P 14 auf einem 1,5%igen Agarosegel.

b: Pvu II-Verdauung der Bgl I-Fragmente B 1 bis B 7 auf einem 0,5%igen Agarosegel.

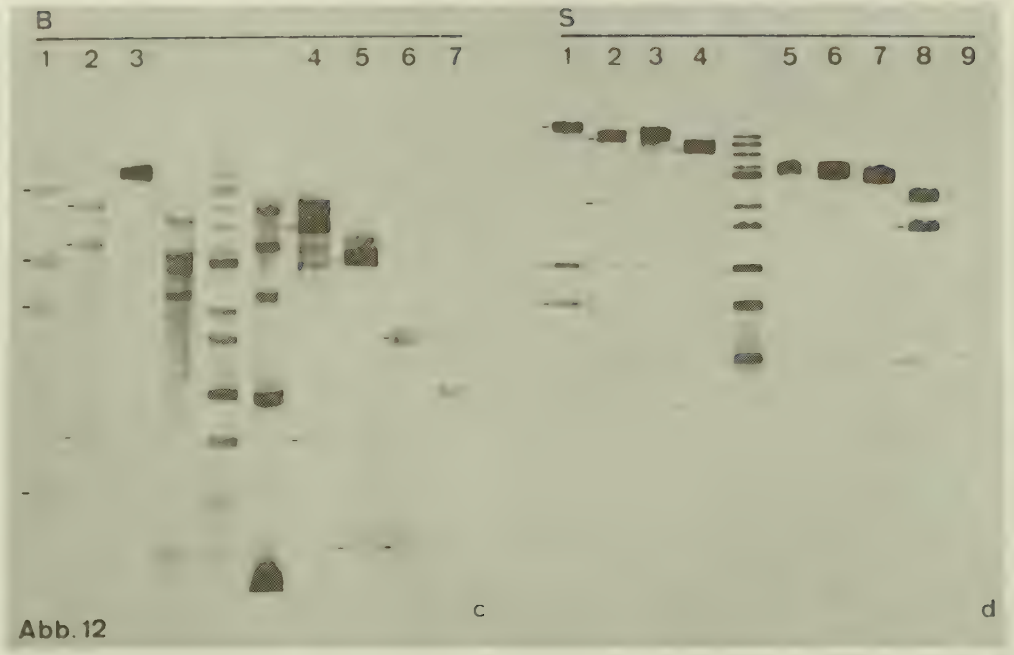


Abb. 12

c: Sal I-Verdauung der Bgl I-Fragmente B 1 bis B 7 auf einem 0,5%igen Agarosegel.

d: Bgl I-Verdauung der Sal I-Fragmente S 1 bis S 9 auf einem 0,5%igen Agarosegel.

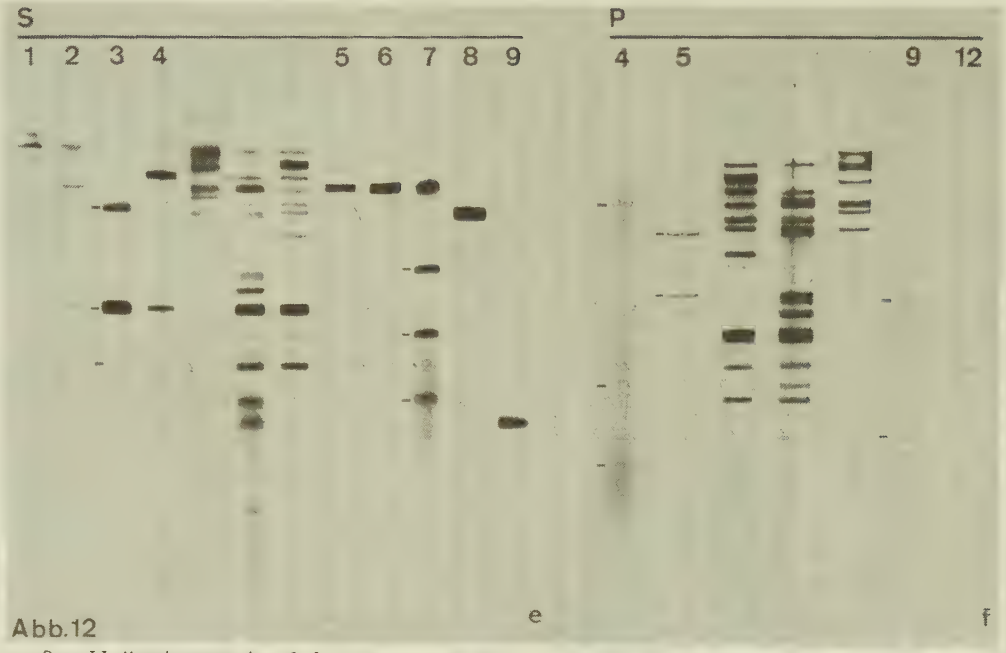


Abb.12

e: Pvu II-Verdauung der Sal I-Fragmente S 1 bis S 9 auf einem 0,7%igen Agarosegel.

f: Sal I-Verdauung der Pvu II-Fragmente P 4, P 5, P 9 und P 12 auf einem 0,7%igen Agarosegel.

Abb. 12: Schmelzverdauungsanalyse isolierter Bgl I-(B), Pvu II-(P), und Sal I-(S) Fragmente zur Kartierung der ptDNA von **E.lanceolatum.** Die Primärfragmente sind entsprechend ihrer Molekülgröße durchnumeriert (vgl. Tab. 4). Die jeweils zentral aufgetragenen Einzel- bzw. Doppelverdauungen der Gesamt-ptDNA dienen der Zuordnung der bei der Nachverdauung von Primärfragmenten entstehenden Subfragmente. Die einem Primärfragment zugeordneten Subfragmente sind durch Striche gekennzeichnet, um sie von Banden zu unterscheiden, die durch unvollständig verdaute Primärfragmente oder durch Cross-Kontamination entstanden.

Tabelle 5

Fragmentgrößen (in kbp) von Doppelverdauungen der ptDNA von E.lanceolatum mit den Restriktionsenzymen Bgl I (B), Pvu II (P) und Sal I (S). Die nach abnehmendem Molekulargewicht durchnumerierten Primärfragmente (Tab. 4), aus denen die Subfragmente beim Schneiden mit dem zweiten Enzym hervorgehen, sind jeweils in der dritten Spalte aufgeführt. Fragmente identischer Größe haben die gleiche Nummer; sofern sie nicht zur invers duplizierten Region gehören, sind sie apostrophiert.

Sekundär-fragmente	Fragment-größe (kbp)	Primär-fragmente (BglI,PvuII)	Sekundär-fragmente	Fragment-größe (kbp)	Primär-fragmente (BglI,SalI)	Sekundär-fragmente	Fragment-größe (kbp)	Primär-fragmente (PvuII,SalI)
BP 1	24,3	B3/P1	BS 1	30,0	B3/S1	PS 1	24,3	P 1/S1
BP 2	17,7	B4/P2	BS 2	22,8	B1/S3	PS 2	14,0	P 2/S4
BP 3	17,6	B2/P3	BS 3	16,0	B2/S2	PS 3	12,3	P 3/S5
BP 4	13,7	B5/P4	BS 4	15,2	B4/S4	PS 4	11,6	P 4/S6
BP 5	11,5	B2/P6	BS 5	12,3	B2/S5	PS 5	11,5	P 6/S2
BP 6	8,8	B1/P8	BS 6	11,1	B5/S6	PS 6	9,8	P 7/S2
BP 7	7,8	B1/P5	BS 7	11,0	B1/S7	PS 7	9,2	P 5/S8
BP 8	7,7	B1/P7	BS 8	7,9	B1/S2	PS 8	8,8	P 8/S3
BP 9	7,3	B1/P9	BS 9	6,4	B6/S8	PS 9	5,0	P 5/S7
BP 10	6,1	B6/P5	BS 10	4,6	B7/S1	PS 10	4,9	P 9/S3
BP 11	3,9	B1/P11		4,6	B7/S1	PS 11	4,5	P 2/S1
BP 11'	3,9	B1/P11'	BS 11	3,4	B4/S1		4,5	P 3/S1
BP 12	3,1	B3/P10		3,4	B4/S1	PS 12	4,0	P10/S1
	3,1	B3/P10	BS 12	2,4	B1/S8		4,0	P10/S1
BP 12'	3,1	B1/P12	BS 13	1,9	B5/S6	PS 13	3,9	P11/S3
BP 13	2,7	B7/P13	BS 13'	1,9	B6/S9		3,9	P11'/S3
	2,7	B7/P13	BS 14	0,6	B6/S6	PS 14	3,2	P12/S7
BP 13'	2,7	B6/P4				PS 15	2,8	P 4/S4
BP 14	2,0	B2/P7				PS 16	2,7	P13/S1
BP 15	1,2	B4/P4					2,7	P13/S1
BP 16	1,0	B7/P2				PS 17	2,1	P 9/S7
	1,0	B7/P3				PS 18	1,9	P 4/S9
BP 17	0,9	B7/P10				PS 19	0,9	P14/S3
	0,9	B7/P10				PS 19'	0,9	P 3/S2
BP 17'	0,9	B1/P14				PS 20	0,45	P 4/S8
	155,6			155,5			153,85	

B 2 wird erst durch den nachfolgenden "Dreisatz" der Tabelle geklärt.

Die eindeutige Zuordnung von Subfragmenten identischer Größen (z.B. BP 13 (2x) und BP 13') zu einem bestimmten Primärfragment ergab sich erst aus der parallelen Betrachtung aller 3 Doppelverdauungen. Fragment BP 13' könnte sowohl durch Überlappung von B 6 (bzw. B 7) mit P 4 als auch durch Überlappung von B 6 (bzw. B 7) mit P 13 entstehen (vgl. Tab. 5). Da die Pvu II-Verdauungen der Sal I-Fragmente S 4, S 6, S 8 und S 9, in denen P 4 und B 6 vollständig enthalten sind, nicht zur Bildung von Fragmenten mit der Größe von BP 13 führen, dagegen aber die Pvu II-Verdauung des Fragments S 1, das vollständig B 7 und P 13 enthält, zur Bildung von zwei Fragmenten BP 13 führt, kann BP 13' den Fragmenten B 6 und P 4 eindeutig zugeordnet werden.

Für jedes einzelne der beiden Subfragmente BP 13 bleiben bzgl. ihrer relativen Lage zu den übrigen Fragmenten zwei mögliche Anordnungen: da sie vollständig innerhalb einer inversen Duplikation des zirkulären ptDNA-Moleküls liegen, können sie sowohl der einen wie auch der anderen invers duplizierten Region widerspruchsfrei zugeordnet werden. Das gleiche gilt für alle übrigen Fragmente, die vollständig zur inversen Duplikation gehören. Die segmentelle Organisation der ptDNA in vier Regionen, von denen zwei invers dupliziert vorliegen, verhindert im vorliegenden Fall außerdem die eindeutige Klärung der relativen Orientierung von Fragmenten der kleinen nicht-repetitiven Region zu denen der großen nicht-repetitiven Region. Es ist somit nicht klar, welches Ende der drei großen, die gesamte kleine nicht-repetitive Region überspannenden Fragmente B 1, P 1 und S 1 zu welchem Ende der großen nicht-repetitiven Region orientiert ist. Eine Klärung dieser Frage wäre möglich, wenn ein Enzym verfügbar wäre, das nur innerhalb der beiden nicht-repetitiven Regionen Schnittstellen hat, so daß man die gesamte inverse Duplikation überspannende Fragmente erhält. Palmer (1983) fand, daß Sal I in der ptDNA von Phaseolus vulgaris keine Erkennungssequenzen in den invers duplizierten Regionen hat und machte bei der Molekulargewichtsbestimmung und Kartierung der Sal I-Fragmente die Entdeckung, daß die ptDNA zu etwa gleichen Teilen in beiden möglichen Orientierungen vorkommt. Inzwischen konnte das Phänomen bei weiteren ptDNAs nachgewiesen werden, und man kann ver-

Tabelle 6

Zusammenstellung der für die Kartierung relevanten Nachverdauungen isolierter Pvu II (P)-, Bgl I (B)- und Sal I (S)-Fragmente. Subfragmente, mit deren Hilfe die Nachbarschaft von Primärfragmenten ermittelt wurde, sind unterstrichen.

Tabelle 6.1

Anordnung der Pvu II-Fragmente (P 1 bis P 14) der ptDNA von E.lanceolatum (ermittelt aus reziproken Doppelverdauungen mit Bgl I und Sal I).

Fragment	Nach-schnitt	Subfragmente	Benachbarte Pvu II-Fragmente
P 7	B	BP 8, 14	
P 6	B	BP 5	
B 2	P	BP 3, 5, 14	P 7 - P 6
P 6	B	BP 5	
P 3	B	BP 3, 16	
B 2	P	BP 3, 5, 14	P 6 - P 3
P 3	B	BP 3, 16	
P13(2x)	B	BP13(2x)	
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	P 3 - P 13
P13(2x)	B	BP13(2x)	
P10(2x)	B	BP12(2x), 17(2x)	
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	P 13 - P 10
P10(2x)	B	BP12(2x), 17(2x)	
P 1	B	BP 1	
B 3	P	BP 1, 12(2x)	P 10-P 1-P 10
P10(2x)	B	BP12(2x), 17(2x)	
P13(2x)	B	BP13(2x)	
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	P 10 - P 13
P13(2x)	B	BP13(2x)	
P 2	B	BP 2, 16	
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	P 13 - P 2
P 2	B	BP 2, 16	
P 4	B	BP 4, 13' 15	
B 4	P	BP 2, 15	P 2 - P 4
P 4	B	PB 4, 13', 15	
P 5	B	BP 7, 10	
B 6	P	BP10, 13'	P 4 - P 5

Fragment	Nach-schnitt	Subfragmente	Benachbarte Bgl I-Fragmente
P 5	S	PS 7, 9	
P12	S	PS14	
S 7	P	PS 9, 14, 17	P 5 - P 12
P12	S	PS14	
P 9	S	PS10, 17	
S 7	P	PS 9, 14, 17	P 12 - P 9

Tabelle 6.2

Anordnung der Bgl I-Fragmente (B 1 bis B 7) der ptDNA von E.lanceolatum (ermittelt aus reziproken Doppelverdauungen mit Pvu II und Sal I).

Fragment	Nach-schnitt	Subfragmente	Benachbarte Bgl I-Fragmente
B 4	P	BP 2, 14	
B 5	P	BP 4	
P 4	B	BP 4, 13', 14	B 4 - B 5
B 5	P	BP 4	
B 6	P	BP10, 13'	
P 4	B	BP 4, 13', 15	B 5 - B 6
B 6	P	BP10, 13'	
B 1	P	BP 6, 7, 8, 9, BP11, 11', 12, 17'	
P 5	B	BP 7, 10	B 6 - B 1
B 1	P	BP 6, 7, 8, 9, BP11, 11', 12, 17'	
B 2	P	BP 3, 5, 14	
P 7	B	BP 8, 14	B 1 - B 2
B 2	P	BP 3, 5, 14	
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	
P 3	B	BP 3, 16	B 2 - B 7
B 7	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	
B 3	P	BP 1, 12(2x)	
P10(2x)	B	BP12(2x), 17(2x)	B 7-B 3-B 7
B 7(2x)	P	BP13(2x), 16(2x), 17(2x)	
B 4	P	BP 2, 15	
P 2	B	BP 2, 16	B 7 - B 4

Tabelle 6.3

Anordnung der Sal I-Fragmente (S 1 - S 9) der ptDNA von E.lanceolatum (ermittelt aus reziproken Doppelverdauungen mit Bgl I und Pvu II)

Fragment	Nach-schnitt	Subfragmente	Benachbarte Sal I-Fragmente
S 1	B	BS 1, 10(2x), 11(2x)	
S 4	B	BS 4, 13	
B 4	S	BS 4, 11	S 1 - S 4
S 4	B	BS 4, 13'	
S 6	B	BS 7, 14	
B 5	S	BS 7, 13'	S 4 - S 6
S 6	P	PS 4	
S 9	P	PS18	
P 4	S	PS 4, 15, 18, 20	S 6 - S 9
S 9	B	BS13	
S 8	B	BS 9, 12	
B 6	S	BS 9, 13, 14	S 9 - S 8
S 8	B	BS 9, 12	
S 7	B	BS 7	
B 1	S	BS 2, 7, 8, 12	S 8 - S 7
S 7	P	PS 9, 14, 17	
S 3	P	PS 8, 10, 13, 13',19	
P 9	S	PS10, 17	S 7 - S 3
S 3	B	BS 2	
S 2	B	BS 3, 8	
B 1	S	BS 2, 7, 8, 12	S 3 - S 2
S 2	B	BS 3, 8	
S 5	B	BS 5	
B 2	S	BS 3, 5, 11	S 2 - S 5
S 5	B	BS 5,	
S 1	B	BS 1, 10(2x), 11(2x),	
B 2	S	BS 3, 5, 11	S 5 - S 1

muten, daß auch bei **Epilobium** aufgrund intramolekularer Rekombination zwischen den beiden invers duplizierten Regionen zwei Typen von ptDNA-Molekülen vorkommen. Die in Abb. 16 in beiden möglichen Positionen dargestellte Pvu II-Schnittstelle innerhalb der kleinen nicht-repetitiven Region der ptDNA von **E.montanum** veranschaulicht die beiden möglichen Orientierungen der nicht-repetitiven Regionen zueinander (zur Kartierung der ptDNA von **E.montanum** s.u.). Neben den Ambivalenzen, die auf die Existenz der inversen Duplikation zurückzuführen sind, bleiben die Positionen der elektrophoretisch nicht zureichend trennbaren Fragmente P 2 (18,8 kbp) und P 3 (18,6 kbp) austauschbar. Außerdem ergab sich nach der Auswertung der Schmelzverdauungen für die Fragmente P 8, P 11, P 11' und P 14 keine eindeutige Anordnung. Alle vier Fragmente sind vollständig in B 1 bzw. S 3 enthalten.

Für die Aufklärung der Fragmentanordnung in der betreffenden Zone wurden sowohl die vier Pvu II-Fragmente P 8, P 11 + P 11' und P 14 als auch ihre Nachbarfragmente P 7 und P 9 radioaktiv markiert und einzeln an Fragmentmuster der Enzyme Bam HI und Eco RI hybridisiert. Benachbarte Pvu II-Fragmente sollten jeweils beide mit dem gleichen die Schnittstelle überlappenden Fragment der beiden erwähnten Enzyme hybridisieren. Es kann dabei allerdings nur dann stichhaltig auf eine Nachbarschaft der betreffenden Pvu II-Fragmente geschlossen werden, wenn das radioaktive Signal an einem Fragment auftritt, das kleiner ist als jedes der beiden Pvu II-Fragmente.

Wie Abb. 13 zeigt, hybridisieren sowohl P 11 + P 11' als auch P 7 mit einem 1,34 kbp großen Eco RI-Fragment. Die Hybridisierung der Fragmente an das Bam HI-Schnittmuster bestätigt diesen Befund, denn sowohl P 7 als auch P 11 + P 11' hybridisieren mit Ba 3 (6,8 kbp). Daraus kann man folgern, daß P 11 + P 11' und P 7 benachbart sind, aber es bleibt offen, welches der beiden 3,9 kbp Fragmente an P 7 angrenzt.

Die Hybridisierung von P 9 und P 8 mit dem gleichen Eco RI-Fragment (3,7 kbp) läßt auf die Nachbarschaft dieser Pvu II-Fragmente schließen. Wie aus Abb. 13 hervorgeht, hybridisiert außerdem P 8 und P 11 + P 11' mit dem gleichen Eco RI-Fragment (4,8 kbp). Daraus ergibt sich die Reihenfolge P 9-P 8-P 11 + P 11'-P 7 wobei das Fragment P 14

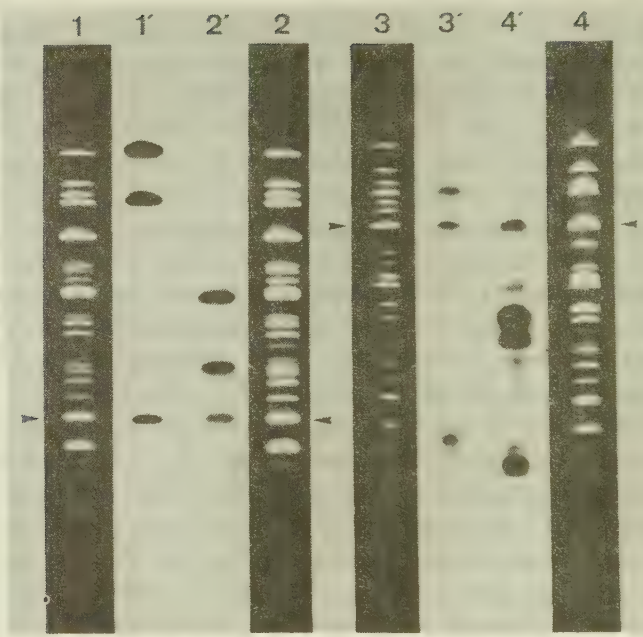


Abb. 13: Hybridisierung radioaktiv markierter Pvu II-Fragmente der ptDNA von **E.lanceolatum** an Nitrozellulose-gebundene Eco RI-Fragmentmuster. Neben den zentral abgebildeten Autoradiographien sind jeweils die in 0,7%iger Agarose aufgetrennten Eco RI-Fragmente angeordnet. Sowohl P 7 (Bahn 1) als auch P 11 + P 11' hybridisieren mit der gleichen Eco RI-Bande (Pfeil). Ein Signal mit dem Eco RI-Fragment E 8 tritt nach Hybridisierung mit P 8 (Bahn 3) und P 9 (Bahn 4) auf (Pfeil). Die neben einigen weiteren Hauptsignalen auftretenden Hintergrund-Signale kommen durch Verunreinigungen der gelelektrophoretisch isolierten Pvu II-Fragmente zustande.

nicht berücksichtigt ist. Da bei der Hybridisierung von P 14 keine eindeutigen Signale mit Bam HI- bzw. Eco RI-Fragmenten auftreten, welche kleiner als P 14 sind, bleibt die Position dieses Fragments offen. Aus den Kartierungsergebnissen der ptDNA von E.watsonii (s.u.) kann aber auf die Nachbarschaft von P 8 und P 14 geschlossen werden, so daß sich die in Abb. 14 dargestellte Anordnung der Fragmente P 8, P 11 + P 11' und P 14 ergibt. Die Austauschbarkeit der Position von

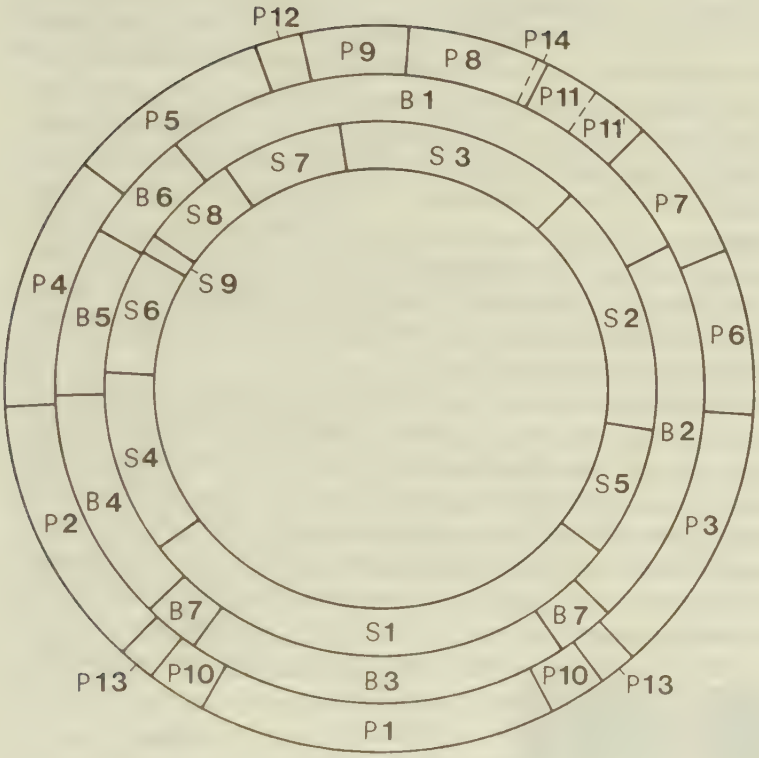


Abb. 14: Physikalische Karte des zirkulären ptDNA-Moleküls von **E.lanceolatum.** Die kartierten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Pvu II (äußerer Kreis), Bgl I (mittlerer Kreis) und Sal I (innerer Kreis) sind als durchgehende Linien auf den entsprechenden Kreisen dargestellt; unterbrochene Linien deuten an, daß die Position benachbarter Fragmente austauschbar ist. Die Fragmentgrößen der nach abnehmendem Molekulargewicht durchnumerierten Fragmente sind aus Tab. 4 zu ersehen.

P 11 und P 11' sowie von P 8 und P 14 ist durch gestrichelte Linien zwischen den betreffenen Fragmenten angedeutet.

Die Kartierung der ptDNA von **E.watsonii**, die durch Schmelzver-

dauungsanalyse mit den Enzymen Bgl I, Pvu II und Sal I durchgeführt wurde, bestätigte für identische Fragmentgrößen die bereits bei E.lanceolatum festgestellte Fragmentanordnung. Für die abweichenden Pvu II- und Sal I-Fragmente ergab sich folgendes Bild: Das bei E.watsonii neu aufgetretene 9,7 kbp Pvu II-Fragment ist wie die Fragmente P 8 und P 14 von E.lanceolatum vollständig in den bei beiden Arten identischen Fragmenten B 1 und B 3 enthalten. Die Fragmente P 8 und P 14 von E.lanceolatum fehlen bei E.watsonii und addieren sich exakt zum Molekulargewicht des 9,7 kbp-Fragments auf, so daß gefolgert werden kann, daß das abweichende Pvu II-Schnittmuster von E.watsonii auf das Fehlen der Pvu II-Erkennungssequenz zwischen den Fragmenten P 8 und P 14 von E.lanceolatum zurückzuführen ist.

Die Differenz im Sal I-Schnittmuster zwischen E.watsonii und E.lanceolatum (s. Abb. 10) ist ebenfalls durch das Fehlen einer Erkennungssequenz des betreffenden Enzyms auf der ptDNA von E.watsonii bedingt. Die Bgl I-Nachverdauung des 36 kbp Sal I-Fragments, das bei E.lanceolatum nicht auftritt, und die reziproke Verdauung der Bgl I-Fragmente zeigen, daß das 36 kbp Fragment mit B 1 und B 2 überlappt. Die Fragmente S 2 und S 5 von E.lanceolatum, die bei E.watsonii fehlen, überlappen ebenfalls mit B 1 und B 2 und addieren sich zu 36,3 kbp auf. Wie Abb. 15 zeigt, hybridisiert ein radioaktiv markier-

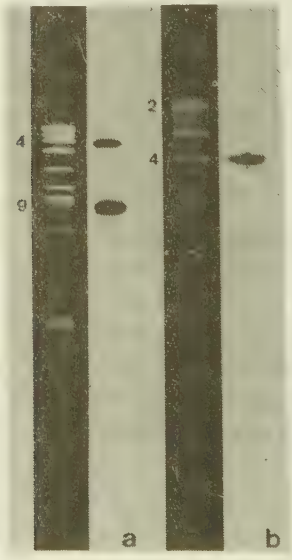


Abb. 15: Zuordnung spezifischer Pvu II- und Sal I-Fragmente der ptDNA von E.montanum (a) und E.watsonii (b) zu kartierten Fragmenten der ptDNA von E.lanceolatum. a: Hybridisierung eines radioaktiv markierten Subfragments (Ba 22) von Fragment P 1 der ptDNA von E.lanceolatum an das Pvu II-Fragmentmuster der ptDNA von E.montanum. Es treten Signale mit den Fragmenten P 4 und P 9 der ptDNA von E.montanum auf. b: Hybridisierung eines radioaktiv markierten Subfragments (Ba 10) von Fragment S 5 der pt-DNA von E.lanceolatum an das Sal I-Fragmentmuster der ptDNA von E.watsonii. Es treten Signale mit den Fragmenten S 2 und S 4 der ptDNA von E.watsonii auf.

tes Subfragment von S 5 der ptDNA von **E.lanceolatum** mit Fragment S 2 der ptDNA von E.watsonii. Die Schnittmusterunterschiede beruhen demnach auf dem Fehlen einer Sal I-Schnittstelle auf der ptDNA von E.watsonii.

Wie Abb. 16 zeigt, ist die bei E.lanceolatum zusätzlich vorhandene Sal I-Erkennungssequenz zwischen S 2 und S 5 in der Grenzregion zwischen inverser Duplikation und der großen nicht-repetitiven Region lokalisiert.

Die physikalische Kartierung der ptDNA von **E.montanum** geschah in Anlehnung an die bereits erörterten Karten von **E.lanceolatum** und E.watsonii. Die Lokalisierung von Schnittmusterunterschieden wurde mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten zwischen differierenden Fragmenten durchgeführt. Wie in Abb. 15 dargestellt, hybridisieren radioaktiv markierte Bam HI-Subfragmente von P 1 der ptDNA von **E.lanceolatum** mit den Fragmenten P 4 und P 9 von E.montanum. Außerdem lassen sich die Molekulargewichte von P 4 und P 9 von **E.montanum** exakt zu demjenigen von P 1 von E.lanceolatum, das bei E.montanum fehlt, aufaddieren. Die Pvu II-Schnittmusterunterschiede beruhen demnach auf dem Vorhandensein einer zusätzlichen Pvu II-Erkennungssequenz innerhalb der kleinen nicht-repetitiven Region der ptDNA von **E.montanum** (s. Abb. 16).

Für das Restriktionsenzym Bgl I fehlt dagegen eine Schnittstelle auf der ptDNA von **E.montanum**, die bei **E.lanceolatum** zwischen B 6 und B 7 lokalisiert ist. Das Molekulargewicht dieser beiden bei E.montanum fehlenden Fragmente (s. Abb. 10) entspricht demjenigen des zusätzlich auftretenden 22,5 kbp Fragments von E.montanum.

Die ptDNA von **E.luteum** hat ein von allen anderen der analysierten zehn Epilobium-Arten abweichendes Pvu II-Schnittmuster. Sie besitzt zwar wie die meisten der übrigen Arten 17 Pvu II-Erkennungssequenzen, jedoch unterscheiden sich die Molekulargewichte der Fragmente P 6 und P 7 von denjenigen der ptDNA von E.lanceolatum. Während P 6 von **E.luteum** um 0,2 kbp kleiner ist als P 6 von E.lanceolatum, ist das benachbarte Fragment P 7 von **E.luteum** um den gleichen Betrag größer als P 7 von E.lanceolatum. Dieses Phänomen tritt wahrscheinlich als Folge einer kleinen Inversion im Grenzbereich von P 6 und P 7 auf; es könnte aber auch auf unabhängige Deletions- und Insertionsereignisse

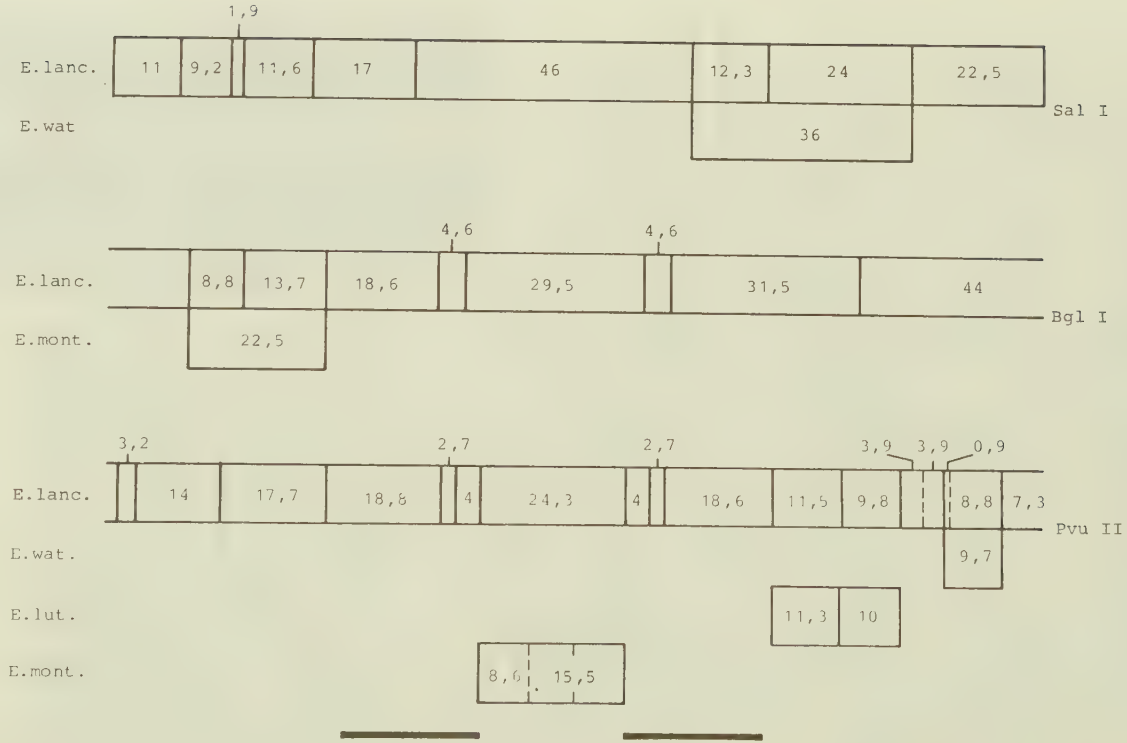

1,9
E.lanc.
11
9,2
13,6
17
46
12,3
24
22,5
Sal I
E.wat
36
4,6
4,6
E.lanc.
8,8
13,7
18,6
29,5
31,5
44
Bgl I
E.mont.
22,5
3,2
2,7
2,7
3,9
3,9
0,9
E.lanc.
14
17,7
18,8
4
24,3
4
18,6
11,5
9,8
8,8
7,3
Pvu II
E.wat.
9,7
E.lut.
11,3
10
E.mont.
8,6
15,5

Abb. 16

Abb. 16: Vergleichende Darstellung der physikalischen Karten der ptDNAs von **E.lanceolatum** (E.lanc.), **E.watsonii** (E.wat.), **E.montanum** (E.mont.) und E.luteum (E.lut.). Die zirkulären ptDNA-Moleküle wurden durch einen zentral in der großen nicht-repetitiven Region gelegenen Sal I-Schnitt linearisiert. Der gleiche Schnitt begrenzt auch die linearisierten Bgl I und Pvu II Kanten. Für die Plastome von E.watsonii, E.montanum und E.luteum sind jeweils nur die gegenüber **E.lanceolatum** geänderten Fragmentgrößen dargestellt. Die Zahlen innerhalb der Fragmente geben die Fragmentgröße in kbp an. Benachbarte Fragmente, deren Position unbestimmt ist, sind durch gestrichelte Linien getrennt. Die beiden schwarzen Balken deuten die Ausdehnung der invers duplizierten Regionen an.

in den Fragmenten P 6 und P 7 zurückzuführen sein. Interessanterweise wurden im Euoenothera-Plastom V (Gordon et al., 1982) und bei Nicotiana (Salts et al., 1984) in der betreffenden Region der ptDNA ähnliche mutative Ereignisse im Vergleich zu anderen Plastomen der betreffenden Gattungen beschrieben.

Fast alle kartierten Schnittmusterunterschiede der untersuchten Plastome sind durch den Wegfall oder das Auftreten von Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme verursacht. Ob diese Veränderungen auf Punktmutationen, Basenmodifikationen oder kleine Deletionen bzw. Insertionen zurückzuführen sind, läßt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht klären. Die genannten Ursachen der Plastomvariation werden bzgl. ihrer Frequenz und Bedeutung bei der Plastomevolution von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert (Kung et al., 1982; Salts et al., 1984).

Bemerkenswert ist das Auftreten der kartierten Plastomvarianzen der zehn untersuchten Epilobium-Arten in Regionen des segmentell organisierten ptDNA-Moleküls, die sich auch beim intragenerischen Plastomvergleich von Oenothera oder Nicotiana als besonders häufig modifiziert erweisen. Die wichtigsten dieser als "hot spots" bezeichneten Regionen liegen an den Grenzen der inversen Duplikation zur großen nicht-repetitiven Region und im Zentrum der beiden nicht-repetitiven Regionen.

Gegenüber diesem intragenerischen Vergleich der ptDNA zeigt der intergenerische Plastomvergleich, daß Änderungen kartierter Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen in allen Bereichen der ptDNA

auftreten. Bereits zwischen **Epilobium** und **Oenothera** treten keine Sal I-Fragmente identischer Größe auf und nur 3 Sal I-Erkennungssequenzen sind bzgl. ihrer Position konserviert, wobei zwei davon in den inversen Duplikationen liegen.

Der Vergleich der ptDNA von **Epilobium** mit derjenigen von **Spinacia**, **Nicotiana** und **Petunia** zeigt, daß die Schnittstellen der Enzyme Bgl I und Sal I zu 20% bis 40% topographisch auf den zirkulären ptDNAs konserviert sind. Von den konservierten Erkennungssequenzen liegen insgesamt über 80% in den inversen Duplikationen, ein Befund, der in guter Übereinstimmung mit der in zahlreichen Untersuchungen festgestellten konservativen Struktur der invers duplizierten Region der ptDNA höherer Pflanzen steht (Palmer & Zamir, 1982).

3.4.3 Genkartierung auf der zirkulären Plastiden-DNA

Zahlreiche Untersuchungen zur molekularen Organisation des Plastoms höherer Pflanzen haben gezeigt, daß auch bei Vertretern phylogenetisch entfernter Taxa relativ umfangreiche Sequenzhomologien der ptDNAs nachweisbar sind. Diese Tatsache ermöglicht in Hybridisierungsexperimenten mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten einerseits den Vergleich der Position einzelner Abschnitte verschiedener ptDNAs zur Erfassung intramolekularer Umstrukturierungen (Palmer & Thomson, 1981); andererseits ist durch die besonders in codierenden Bereichen der ptDNA festgestellte Sequenzkonservierung (z.B. haben die LSU-Gene von Mais und Spinat nur 16% Divergenz: Whitfeld & Bottomley, 1983) die Voraussetzung gegeben, um eine exakte Lokalisierung bekannter Gene auf den ptDNAs verschiedener Gattungen durchzuführen.

Nachdem bei der physikalischen Kartierung der **Epilobium**-Plastome durch das Auftreten invers duplizierter Regionen klare Hinweise auf die bei den meisten bisher untersuchten ptDNAs gefundene Gliederung in zwei inverse Duplikationen sowie eine große und eine kleine nichtrepetitive Region vorlagen, wurde zunächst durch Hybridisierung klonierter, radioaktiv markierter Fragmente der ptDNA von Spinat die Ausdehnung der repetitiven Regionen bestimmt. Dazu wurde das fünfte Sal I

Fragment von Spinat (vgl. Herrmann et al., 1980c) an Sal I/Bgl I-Doppelverdauungen verschiedener Epilobium-Plastome hybridisiert. Dabei traten Signale mit den Fragmenten SB 4 (einem Subfragment von B 4) und SB 5 (entspricht S 5) der ptDNA von E.lanceolatum auf. Demzufolge muß die Grenze zwischen der inversen Duplikation und der großen nicht-repetitiven Region bei E.lanceolatum innerhalb des Fragments S 5 bzw. S 4 liegen . Die Grenze zwischen der inversen Duplikation und der kleinen nicht-repetitiven Region liegt im Fragment P 1, das von den beiden Fragmenten P 10 symmetrisch flankiert wird. Da Reihenfolge und Anzahl der in den inversen Duplikationen gelegenen Gene für die ribosomalen RNAs auf den bisher untersuchten ptDNAs höherer Pflanzen identisch sind (Palmer & Thomson, 1981, 1982; Whitfeld & Bottomley, 1983), wurde auf eine Lokalisierung der rRNA-Gene verzichtet.

Dagegen wurde eine Kartierung der meisten bisher bekannten proteincodierenden Gene der ptDNA mit den in Tab. 7 aufgelisteten Strukturgenen der ptDNA von Spinat durchgeführt. Die Publikationen in denen zum ersten Mal die Lokalisierung der entsprechenden Gene auf der ptDNA beschrieben ist, sind aus der dritten Spalte der Tabelle zu ersehen. Für die Hybridisierungsexperimente wurden nur die gentragenden Bereiche von klonierten Fragmenten der ptDNA von Spinat verwendet.

Wie Abb. 17 zeigt, entstanden bei der Hybridisierung der betreffenden radioaktiv markierten Gen-Sonden mit Fragmenten der ptDNA von Epilobium stets spezifische Signale. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Sie bestätigten ausnahmslos die aus der physikalischen Kartierung abgeleiteten Fragmentüberlappungen.

Das Gen des 51 kd Proteins von Photosystem II liegt wie bei Spinat und Oenothera in der großen nicht-repetitiven Region oberhalb der "linken" inversen Duplikation (s. Abb. 18). Auch das nächstliegende kartierte Gen für das Apoprotein des Cytochrom f hat eine gegenüber Oenothera und Spinacia konservierte Position. Die drei im Uhrzeigersinn folgenden Gene haben im Vergleich zu Oenothera eine deutlich abweichende Lage auf der ptDNA, obwohl Oenothera eine eng verwandte Gattung von Epilobium ist. Es handelt sich bei den drei Genen um die große Untereinheit (LSU) der Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase/Oxygenase sowie um die benachbarten Gene für die ß- und ε-Unter-

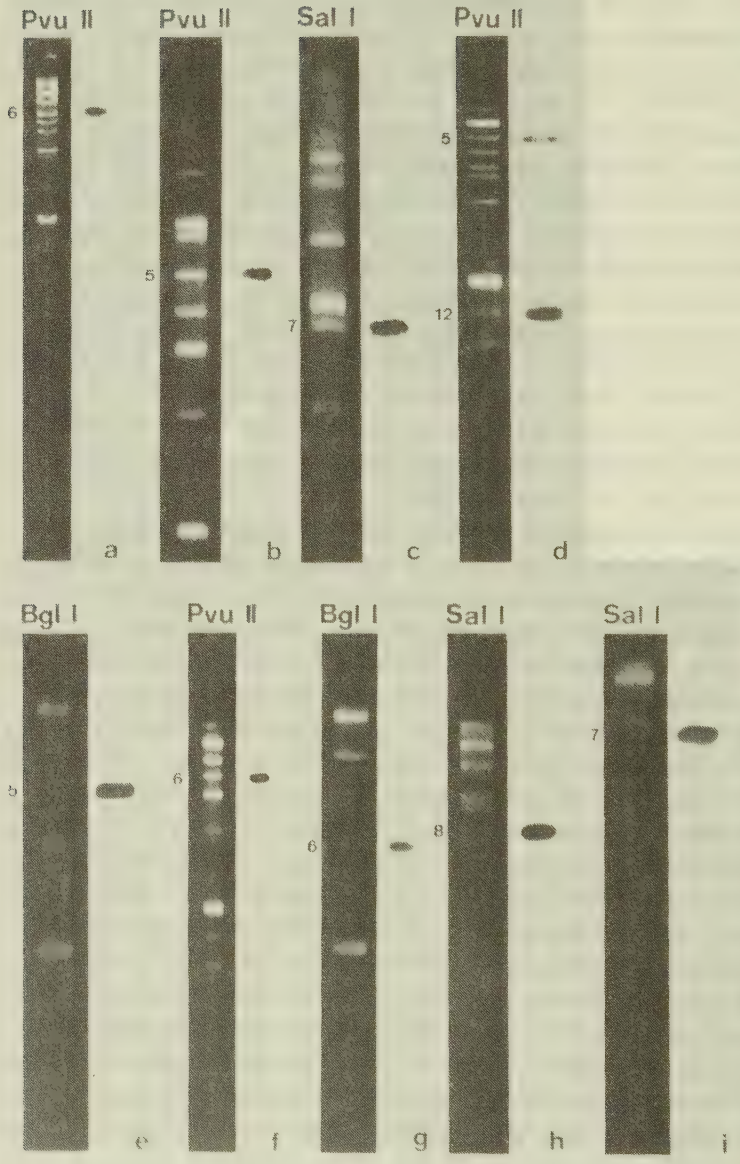

Pvu II
Pvu II
Sal I
Pvu II
6
5
7
5
12
a
b
c
d
Bgl I
Pvu II
Bgl I
Sal I
Sal I
5
6
6
8
7
e
f
g
h
i

Abb. 17

Abb. 17: Lokalisierung von Genen auf der ptDNA von Epilobium. Links in jedem Block sind die Fragmentmuster, an welche ein radioaktiv markierter Genabschnitt der ptDNA von Spinat hybridisiert wurde, abgebildet. Fragmente, mit denen Signale auftraten, sind numeriert (die Fragmentgrößen sind aus Tab. 4 zu ersehen).
a: Hybridisierung des CF_1-α-Gens an das Pvu II-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.luteum. **b:** Hybridisierung des CF_1-ß-Gens an das Pvu II-Fragmentmuster (0,4%iges Agarosegel) der ptDNA von E.watsonii. **c:** Hybridisierung des CF_1-ß-Gens an das Sal I-Fragmentmuster (0,4%iges Agarosegel) der ptDNA von E.watsonii. **d:** Hybridisierung des CF_1-ε-Gens an das Pvu II-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.lanceolatum. **e:** Hybridisierung des Gens für das PS II-1-Protein an das Bgl I-Fragmentmuster (0,5%iges Agarosegel) der ptDNA von E.lanceolatum. **f:** Hybridisierung des Gens für das PS II-3-Protein an das Pvu II-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.lanceolatum. **g:** Hybridisierung des Cytochrom f-Gens an das Bgl I-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.lanceolatum. **h:** Hybridisierung des Cytochrom f-Gens an das Sal I-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.lanceolatum. **i:** Hybridisierung des LSU-Gens an das Sal I-Fragmentmuster (0,7%iges Agarosegel) der ptDNA von E.watsonii.

Tabelle 7

Lokalisierung verschiedener proteincodierender Gene auf Bgl I (B)-, Pvu II (P)- und Sal I (S)-Fragmenten der ptDNA von Epilobium. Fragmente, deren Hybridisierung mit radioaktiven Gen-Sonden der ptDNA von Spinat in Abb. 17 dargestellt ist, sind unterstrichen.

Gene der pt-DNA	Abk.	erstmalige Lokalisierung auf der pt-DNA von Spinacea	Gentragende Fragmente der pt-DNA von Epilobium
ATP-Synthase			
CF_1 α	α		B 6, P 2
CF_1 β	β	Westhoff et al., 1981	B 1, P 5, S 7
CF_1 ε	ε		P 9, P 12
51 kd Protein von PS II	PS II-1	Westhoff et al., 1983a	B 5, S 6, BS 7
32 kd Protein (herbizidbindendes) von PS II	PS II-3	Driesel et al., 1980	B 2, P 6, S 2, BS 3
Cytochrom f	Cyt f	Alt et al., 1983	B 6, S 8, BS 9
Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase/ Oxygenase (große Untereinheit)	LSU	Whitfeld & Bottomley, 1980	P 5, S 7

einheiten der ATP-Synthase. Alle drei Gene sind bei **Oenothera** durch eine große Inversion von ca. 45 kbp innerhalb der großen nicht-repetitiven Region in die Nähe des Gens für das 32 kd Polypeptid von Photosystem II gerückt (Herrmann et al., 1983). Ihre Position entspricht auf der ptDNA von **Epilobium** genau derjenigen, die bei Spinat festgestellt wurde (Whitfeld & Bottomley, 1980; Westhoff et al., 1981).

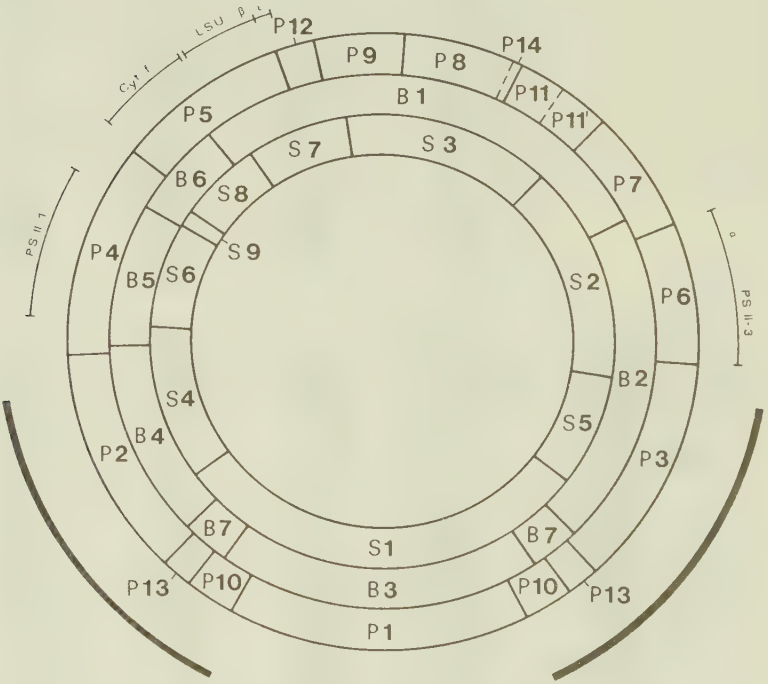


Abb. 18: Genkarte der ptDNA von Epilobium. Die Bereiche, innerhalb derer plastidäre Gene liegen, sind als Kreisabschnitte außerhalb der physikalischen Karte der ptDNA von E.lanceolatum dargestellt. Die Abkürzungen für die kartierten Gene sind in Tab. 7 erläutert. Die symmetrisch angeordneten breiten Kreisabschnitte deuten die Ausdehnung der invers duplizierten Regionen an.

Wie auf Abb. 17 zu sehen, liegt bei **Epilobium** die Pvu II-Schnittstelle zwischen Fragment P 12 und P 5 innerhalb des Gens für die ε-Untereinheit der ATP-Synthase, denn mit beiden Fragmenten tritt eine Hybridisierung auf. Da das Signal mit Fragment P 12 deutlich stärker als dasjenige mit P 5 ausfällt, kann angenommen werden, daß der größere Teil des Strukturgens auf Fragment P 12 liegt. Sowohl das Gen der ß-Untereinheit der ATP-Synthase, das auf der ptDNA von Spinat mit vier Nukleotiden das Gen der ε-Untereinheit überlappt, als auch das LSU-Gen sind auf Fragment PS 9 der ptDNA von **Epilobium** lokalisiert. Das Gen für die α-Untereinheit der ATP-Synthase, das bei Oenothera als Teil der großen Inversion in die Nähe des Gens für das Apoprotein von Cytochrom f gerückt ist, liegt auf der ptDNA von Epilobium entsprechend den Verhältnissen bei Spinat ca. 15 kbp vom Gen des herbizidbindenden 32 kd Proteins von Photosystem II entfernt. Die Position dieses Gens ist, wie aus Abb. 19 hervorgeht, bei allen drei Gattungen auf der ptDNA konserviert.

Insgesamt zeigen die Daten der Genkartierung, daß die Genanordnung auf der ptDNA von Epilobium derjenigen bei Spinat entspricht. Sie weicht von derjenigen bei Oenothera bzgl. der Gene ab, die innerhalb der großen 45 kbp Inversion liegen (s. Abb. 19). Intragenerisch wurden zwischen den untersuchten Epilobium-Arten keine Unterschiede bzgl. der Position der sieben kartierten Gene festgestellt.

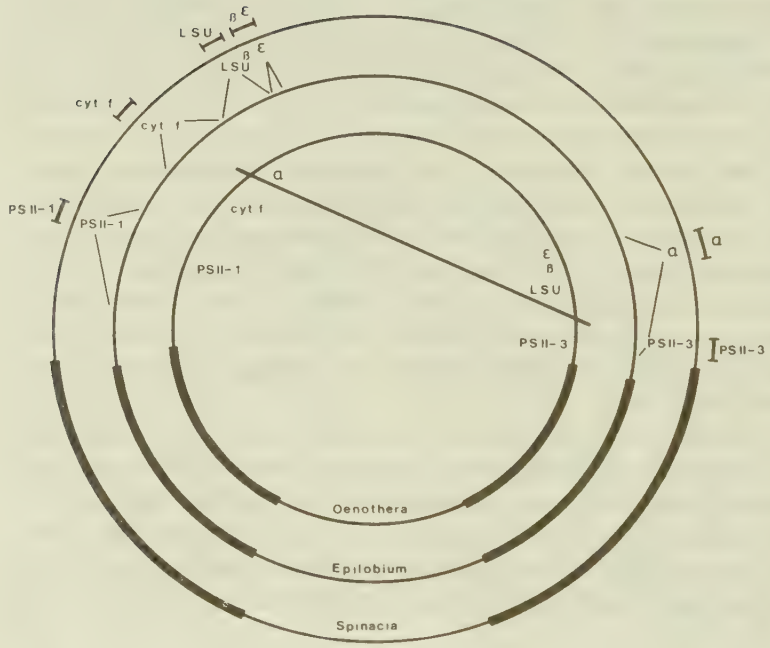


Abb. 19: Vergleichende Darstellung von Genpositionen auf den zirkulären ptDNAs von **Spinacia** (äußerer Ring), **Epilobium** (mittlerer Ring) und Oenothera (innerer Ring). Die Genkarten von Spinat und Oenothera sind aus Herrmann et al. (1983) übernommen. Die Ausrichtung der ptDNAs von Epilobium und Spinat wurde mit Hilfe des bei beiden Gattungen relativ genau kartierten Gens für die ε-Untereinheit der ATP-Synthase vorgenommen. Die Genkarten von Spinat und Oenothera sind anhand eines 0,45 Md Sal I-Fragments aufeinander abgestimmt (vgl. Herrmann et al., 1983). Die Sekante im zirkulären ptDNA Molekül von Oenothera gibt die Ausdehnung der Inversion an. Die Kreisabschnitte außerhalb der ptDNA von Spinat geben die Ausdehnung der plastidären Gene an (die abgekürzten Genbezeichnungen sind in Tab. 7 erläutert). Im mittleren Zirkel sind die Bereiche abgegrenzt, innerhalb derer die betreffenden Gene kartiert wurden. Die invers duplizierten Regionen sind durch breite schwarze Linien hervorgehoben.

3.4.4 Bestimmung des Plastidenerbgangs durch Untersuchung der Plastiden-DNA interspezifischer Bastarde

Die molekulargenetische Charakterisierung verschiedener Epilobium-Plastome diente einerseits der vergleichenden Betrachtung der intra- und intergenerischen Plastomevolution; andererseits schuf sie die Voraussetzungen für die Untersuchung der Vererbung eines Plastoms bei der Kombination mit genotypischem Material verschiedener Arten sowie für die Analyse der Vererbung verschiedener Plastome in mehreren interspezifischen Kreuzungen. Diese Möglichkeiten sind besonders vor dem Hintergrund der Tatsache wichtig, daß der Plastidenerbgang bei der Kombination unterschiedlichen genomischen Materials mit verschiedenen Plastomen innerhalb einer Gattung erheblich variieren kann (z.B. bei Oenothera, vgl. Stubbe, 1959).

3.4.4.1 Fragmentmusteranalyse der Plastiden-DNA von Arthybriden

Durch den Vergleich des Schnittmusters der ptDNA aus Plastiden der Filialgeneration mit den artspezifischen Mustern der ptDNAs beider Eltern ist eine Aussage über die Herkunft der Plastiden der Nachkommenschaft und damit über den Plastidenerbgang möglich. Die methodische Limitation des Verfahrens ist durch die Nachweisgrenzen einer artspezifischen DNA in einer heterogenen DNA-Probe vorgegeben. Daher wurde in einem Vorversuch die minimale Menge eines Fragmentmusters bestimmt, die sich nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar machen läßt.

Abb. 20 zeigt Mischungen der ptDNAs von E.montanum und E.lanceolatum, die mit der Restriktionsendonuklease Pvu II geschnitten wurden. Anhand der 24,3 kbp Bande P 1, die im E.lanceolatum-Schnittmuster (Bahn 1) einmolar vorhanden ist und im E.montanum Schnittmuster (Bahn 10) fehlt, läßt sich in Mischungen (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:5000) beider DNAs feststellen, bis zu welcher Konzentration die unterrepräsentierte DNA in einer heterogenen Probe nachweisbar ist. Die Nachweisgrenze liegt im vorliegenden Versuch bei ca. 0,5%. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das relativ hohe Moleku-

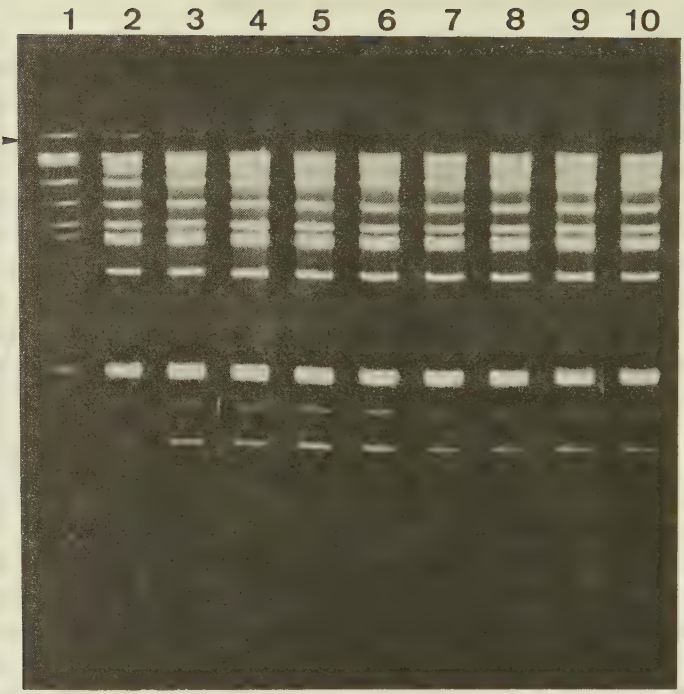


Abb. 20: Gelelektrophoretische Auftrennung (0,7%iges Agarosegel) von DNA-Mischungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze für eine unterrepräsentierte DNA in einer heterogenen Probe. Bahn 1 zeigt das Pvu II-Fragmentmuster der ptDNA von E.**lanceolatum**, Bahn 10 dasjenige von E.**montanum**. Auf den Bahnen 2 bis 9 sind die Mischungen beider DNAs im Verhältnis 1:5 (Bahn 2), 1:10 (Bahn 3), 1:50 (Bahn 4), 1:100 (Bahn 5), 1:200 (Bahn 6), 1:500 (Bahn 7), 1:1000 (Bahn 8) und 1:5000 (Bahn 9) aufgetrennt. Das Fragment P 1 der ptDNA von E.**lanceolatum** (Pfeil), das im Pvu II-Fragmentmuster von E.**montanum** fehlt, ist noch in einer Mischung von 1:200 erkennbar.

largewicht des artunterscheidenden Fragments eine günstige Voraussetzung für seine Sichtbarmachung im UV-Licht darstellt. Je nach Größe des spezifischen DNA-Fragments lag in Parallelversuchen die Nachweisgrenze zwischen 1% und 3%. Durch Gelüberladung kann die Nachweisgrenze noch etwas erweitert werden (Schiller et al., 1982).

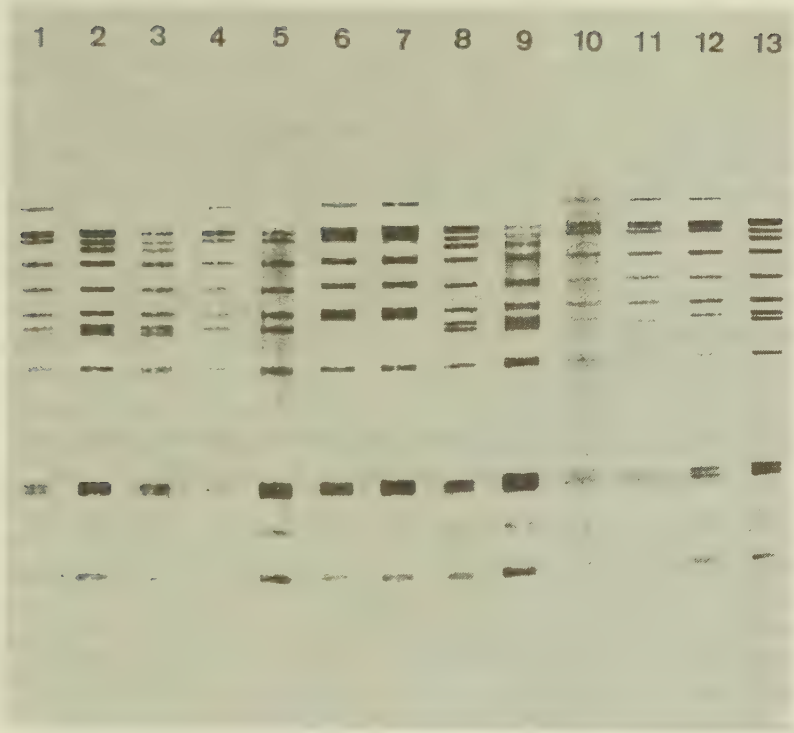


Abb. 21: Pvu II-Fragmentmuster der ptDNAs einiger Epilobium-Artbastarde (0,5%iges Agarosegel) und der zugehörigen Parentaltypen: E.**lanceolatum** x E.**montanum** (Bahn 1), E.montanum (Bahn 2); das nicht abgebildete Fragmentmuster von E.**lanceolatum** entspricht dem von E.**parviflorum** (vgl. Bahn 4); E.montanum x E.parviflorum (Bahn 3), E.parviflorum (Bahn 4), E.**parviflorum** x E.**montanum** (Bahn 5); das größte Fragment ist hier aufgrund von Degradation nicht erkennbar. E.watsonii x E.montanum (Bahn 6), E.**watsonii** (Bahn 7), E.**montanum** x E.**watsonii** (Bahn 8), E.**montanum** (Bahn 9), E.hirsutum x E.montanum (Bahn 10), E.**hirsutum** (Bahn 11), E.**hirsutum** x E.**montanum** (Bahn12), E.**montanum** x E.hirsutum (Bahn 13). Bei dem Fragmentmuster auf Bahn 10 handelt es sich um die ptDNA einer einzigen Pflanze der Kreuzung E.**hirsutum** x E.montanum, die phänotypisch stark dem männlichen Elter (E.hirsutum) glich. In keinem ptDNA-Fragmentmuster der untersuchten Artbastarde treten Fragmentgrößen auf, die für die paternale ptDNA spezifisch sind.

Die ptDNAs der Nachkommenschaften mehrerer interspezifischer Kreuzungen wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, die ein leicht unterscheidbares Fragmentmuster beim Schneiden der elterlichen ptDNAs zeigten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 21 dargestellt. In allen Kreuzungen wurde eine maternale Vererbung der ptDNA und damit auch der Plastiden festgestellt. Selbst die separat isolierten Plastiden einzelner Hybrid-Pflanzen, welche phänotypisch stark dem Vater ähnelten, hatten ein maternal vererbtes ptDNA-Schnittmuster (vgl. Abb. 21, Bahn 10). Eine Beteiligung paternaler Plastiden am Plastidom der Nachkommenschaft in der Größenordnung von 0,5% und mehr kommt den vorangehenden Experimenten zufolge in den untersuchten Artbastarden von Epilobium nicht vor.

3.4.4.2 Untersuchung des Plastidenerbgangs mittels radioaktiv markierter artspezifischer Fragmente der Plastiden-DNA

Aufgrund der Tatsache, daß auch bei Vorhandensein von ca. 5000 paternalen Plastiden in einem einzigen Blatt einer adulten Arthybride (im voll entwickelten Blatt von Epilobium sind etwa 10^6 Plastiden vorhanden, Bartels, 1964) ein Nachweis derselben bei Anwendung des im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Verfahrens nicht möglich gewesen wäre, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Nachweisgrenze für geringe Mengen paternaler ptDNA zu erweitern. Als hochsensible Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten mit spezifischer Sequenz wurde die radioaktive Markierung von Teilen der ptDNA und ihre Hybridisierung an ptDNA-Schnittmuster von Arthybriden herangezogen. Da bisher keine längeren artspezifischen ptDNA-Sequenzen bei höheren Pflanzen nachgewiesen wurden, die als Unterscheidungsmerkmal für das Verfahren verwendbar wären, ist es sinnvoll, solche Fragmente zu markieren, die durch Verlust oder Neuerwerb einer Schnittstelle eines bestimmten Restriktionsenzyms eine artspezifische Molekülgröße haben. Die Hybridisierung solcher Fragmente an ptDNAs zweier Arten, die ein differentes Fragmentmuster für das betreffende Restriktionsenzym haben, ergibt Signale mit Fragmenten verschiedener Größe, so daß eine klare Unterscheidung paternaler und maternaler ptDNA in Autoradiographien der ptDNA von

Artbastarden möglich ist.

Zur Analyse des Plastidenerbgangs mit dem beschriebenen Verfahren wurden die ptDNAs reziproker Artbastarde isoliert und mit den Restriktionsenzymen Pvu II bzw. Sal I, für die Schnittmusterunterschiede kartiert sind, verdaut. Nach Auftrennung im Agarosegel wurden die Fragmente an Nitrozellulosefilter gebunden (Southern, 1975; Rigby et al., 1977). Zur Untersuchung von Kreuzungen, in denen **E.montanum** vorkommt, wurden die Fragmente P 4 und P 9, die bei allen anderen Arten wegen des Fehlens einer Schnittstelle das Fragment P 1 bilden, radioaktiv markiert und an Nitrozellulosefilter hybridisiert. Die mit Sal I verdauten ptDNAs von Artbastarden, bei denen **E.watsonii** ein Elter war, wurden dagegen mit den radioaktiv markierten Fragmenten S 2 und S 5 von **E.lanceolatum**, **E.hirsutum**, **E.montanum** oder **E.parviflorum** analysiert, da diese beiden Fragmente bei **E.watsonii** ein einziges 37 kbp großes Fragment bilden.

Zunächst wurde in Vorversuchen die Nachweisgrenze für die unterrepräsentierte DNA einer heterogenen DNA-Probe bestimmt. Als Mischproben dienten wieder die mit Pvu II verdauten ptDNAs von **E.montanum** und **E.lanceolatum**. Die Fragmente P 4 und P 9 wurden über Agarosegele aufgetrennt, gereinigt (vgl. 2.3.4.2) und radioaktiv markiert. Dabei zeigte sich, daß die so gereinigten Fragmente in Autoradiographien von DNA-Mischungen nicht zu befriedigenden Intensitätsunterschieden zwischen schwachen Signalen der unterrepräsentierten DNA und unspezifischen Hintergrund-Signalen führten.

Um ausreichende Mengen der betreffenden DNA-Fragmente in einem höheren und konstanten Reinheitsgrad verfügbar zu haben, wurden Teile der Fragmente P 1 und S 5 der ptDNA von **E.lanceolatum** kloniert. Abb. 22 zeigt mehrere klonierte Bam HI Subfragmente von P 1 und S 5, die in den Vektor pEMBL8$^-$ integriert und im Escherichia coli-Stamm K12 71/18 vermehrt wurden. Aus Abb. 23 geht hervor, mit welchen artspezifischen Fragmenten von **E.montanum** und **E.watsonii** die klonierten Bam HI-Fragmente hybridisieren.

Die Verwendung gereinigter klonierter Fragmente als radioaktive Sonden führte zu einer Verbesserung der Möglichkeiten für den Nachweis geringer Mengen einer spezifischen DNA in einer heterogenen Probe. Die

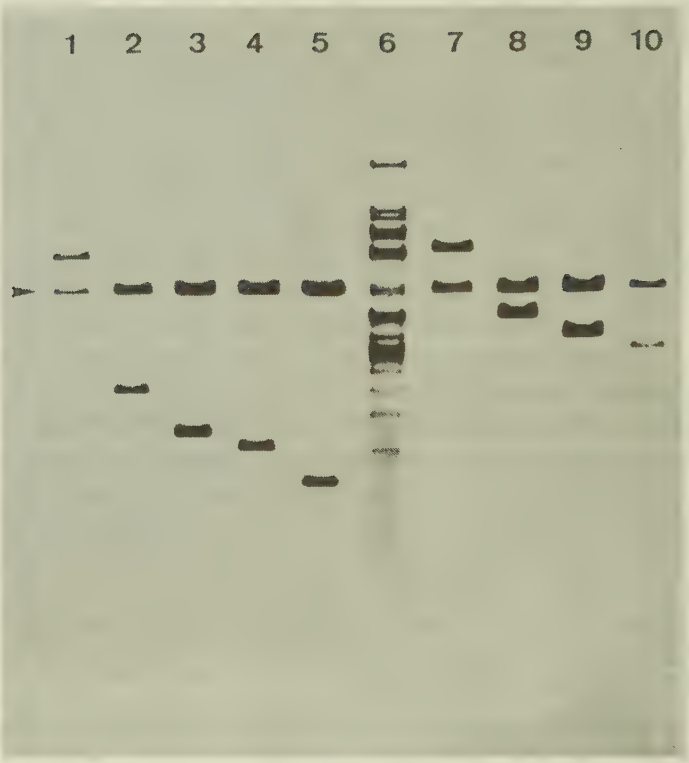


Abb. 22: Klonierte Fragmente der ptDNA von E.lanceolatum. Die in den Vektor pEMBL 8⁻ inserierten Bam HI-Fragmente und die linearisierte Plasmid-DNA (Pfeil) wurden in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Auf Bahn 1 bis 5 wurden klonierte Bam HI-Fragmente, die Teil von P 1 (24,3 kbp) sind, aufgetragen; Bahn 1: Ba 7 (5,0 kbp), Bahn 2: Ba 17 (1,82 kbp), Bahn 3: Ba 22 (1,27 kbp), Bahn 4: Ba 23 (1,12 kbp), Bahn 5: Ba 25 (0,8 kbp). Bahn 6 zeigt das Bam HI-Schnittmuster der ptDNA von E.lanceolatum. Auf Bahn 7 bis 10 sind weitere klonierte Bam HI-Fragmente dargestellt, von denen Ba 10 (Bahn 8) ein Subfragment des Fragments S 5 der ptDNA von E.lanceolatum ist. Zur Untersuchung des Plastidenerbgangs wurden ausschließlich die klonierten Fragmente Ba 10 und Ba 17 verwendet.

in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich mit Hilfe dieser Methode die Nachweisgrenze für geringe Mengen paternaler DNA in einer hybriden Nachkommenschaft auf 0,05% erweitern läßt. Die mit diesen Voraussetzungen deutlich verbesserten Möglichkeiten für den Nachweis unterrepräsentierter paternaler ptDNA in einer Nachkommenschaft aus Arthybriden wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen genutzt:

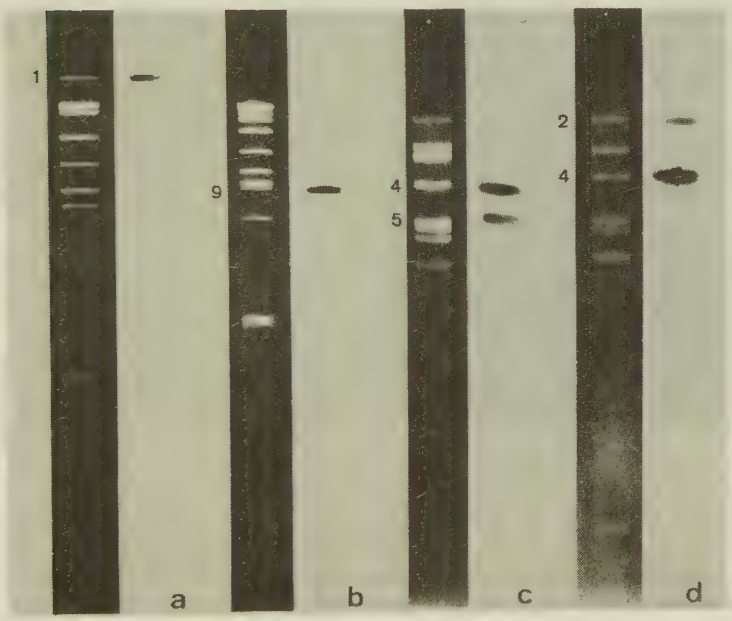


Abb. 23: Hybridisierung klonierter, radioaktiv markierter Bam HI-Fragmente mit artspezifischen Pvu II (a,b) - bzw. Sal I-Fragmenten (c,d) der ptDNA (0,5%ige Agarosegele). Ba 17 (a,b) führt zu Signalen mit Fragment P 1 von **E.lanceolatum** (a) und Fragment P 9 von **E.montanum** (b). Ba 10 (c,d) führt zu Signalen mit Fragment S 5 von E.lanceolatum (c) und Fragment S 2 von **E.watsonii** (d). Da Ba 10 zur invers duplizierten Region der ptDNA gehört, tritt außerdem jeweils ein weiteres Signal mit Fragment S 4 auf.

Abb. 24: Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Mengen durch Hybridisierung mit klonierten, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten.
a: Gelelektrophoretisch (0,5%iges Agarosegel) aufgetrennte Pvu II-Fragmente der ptDNA von E.**montanum** (Bahn 1) und von Mischungen derselben mit Pvu II-verdauter ptDNA von E.lanceolatum im Verhältnis 1:10 (Bahn 2), 1:50 (Bahn 3), 1:500 (Bahn 4) und 1:5000 (Bahn 5).
b: Hybridisierung des radioaktiv markierten Fragments Ba 17 an die in a dargestellten, an Nitrozellulose gebundenen Fragmente. Ba 17 hybridisiert mit Fragment P 9 der ptDNA von E.**montanum** (Bahn 1) und mit Fragment P 1 der ptDNA von E.**lanceolatum** (vgl. Abb. 23). Beim Mischungsverhältnis von 1:5000 der ptDNA von E.**montanum** mit derjenigen von E.**lanceolatum** tritt noch ein Signal mit dem für E.**montanum** spezifischen Fragment P 9 auf. Die übrigen Signale sind durch die lange Expositionszeit (ca. 2 Wochen) verbreitert.

1.) Untersuchung des Plastidoms in verschiedenen Entwicklungsstadien der F 1

Da die Segregation von paternalen Plastiden, die zufällig in die Zygote gelangt sind, je nach Verlauf der Entmischung relativ früh abgeschlossen sein kann, wurden Pflanzen in drei frühen ontogenetischen Stadien hinsichtlich ihres Plastidoms untersucht. Dazu wurden die Plastiden aus Pflänzchen unmittelbar nach der Primärblattbildung (ca. 1 cm groß) sowie aus 5 cm und 10 cm großen Pflanzen isoliert. Für die Isolation wurden alle oberirdischen Teile von jeweils 100 bis 150 Pflanzen verwendet. Bei der Hybridisierung von radioaktiv markierten, klonierten Fragmenten an Auszüge der ptDNA dieser Pflanzen traten nur Signale mit den für die maternale ptDNA spezifischen Fragmenten auf. Diesen Ergebnissen zufolge sollte eine frühzeitige Entmischung maternaler und paternaler Plastiden in den ersten Abschnitten der Ontogenie der Nachkommenschaft nicht als wesentliches Argument für das Fehlen paternaler Plastiden in der Nachkommenschaft diskutiert werden.

2.) Untersuchung des Plastidoms in verschiedenen interspezifischen Bastarden

Zur Klärung der Frage, ob sich bei Epilobium durch Kombination von unterschiedlichem genomischen und plasmonischen Material bestimmter Artbastarde ein Einfluß auf den Modus der Plastidenvererbung feststellen läßt, wurden die in Abschnitt 3.4.4.1 untersuchten Artbastarde sowie wuchsgestörte reziproke Bastarde mit dem verfeinerten Nachweisverfahren für paternale Plastiden getestet (Ausgangsmaterial: ca. 50 Pflanzen von jeder Kreuzung). Die in Abb. 25 dargestellten Autoradiographien zeigen ein konstant maternales Vererbungsmuster der ptDNA.

Abb. 25: Hybridisierung des radioaktiv markierten Fragments Ba 17 (a,b) bzw. Ba 10 (c) der ptDNA von **E.lanceolatum** an Pvu II (a,b) - bzw. Sal I (c) - verdaute ptDNAs verschiedener **Epilobium**-Artbastarde (0,5%ige Agarosegele). In allen Fällen treten ausschließlich Signale mit den für die maternale ptDNA spezifischen Fragmenten auf.
a: ptDNA von **E.watsonii** x **E.montanum** (Bahn 1), des reziproken Bastards (Bahn 3) sowie der beiden Eltern **E.watsonii** (Bahn 2) und **E.montanum** (Bahn 4). **b:** ptDNA von **E.hirsutum** x **E.montanum** (Bahn 3) und des reziproken Bastards (Bahn 4) sowie der Eltern **E.montanum** (Bahn 1) und **E.hirsutum** (Bahn 2). **c:** ptDNA wuchsgestörter Bastarde der Kreuzugen **E.hirsutum** x **E.watsonii** (Bahn 1) und **E.parviflorum** x **E.watsonii** (Bahn 2).

3.) Untersuchung des Plastidoms einer großen Nachkommenschaft

Der dritte experimentelle Ansatz diente der Untersuchung der Frage, ob in einer großen Nachkommenschaft alle Pflanzen konstant nur das maternale Plastom erhalten oder ob Ausnahmen auftreten. Diese Frage zielt auf die evolutiv bedeutsame Problematik der Exaktheit, mit der ein Mechanismus uniparentaler Vererbung plasmatischer Konstituenten arbeitet. Zur Untersuchung dieser Frage wurden Plastidenisolationen aus ca. 2000 Pflanzen der Kreuzungen E.watsonii x E.montanum und E.parviflorum x E.montanum durchgeführt. Um die Nachweismöglichkeit für paternale Plastiden vor dem großen Hintergrund maternal vererbter Plastiden zu verbessern, wurden die Plastiden jeweils aus Gruppen von etwa 200 Pflanzen isoliert.

Bei der Hybridisierung mit einem klonierten Bam HI-Subfragment des für den männlichen Parens spezifischen Fragments P 9 an die Pvu II-Schnittmuster der ptDNA aller Gruppen traten stets Signale mit dem für die maternale ptDNA spezifischen Fragment P 1 auf. In einer Gruppe von Artbastarden der Kreuzung E.watsonii x E.montanum erschien zusätzlich ein schwaches Signal exakt in Höhe des für die ptDNA von E.montanum spezifischen Fragments P 9 (s. Abb. 26).

Der quantitative Anteil der paternalen ptDNA läßt sich anhand der Autoradiographie nur grob schätzen. Er liegt in den analysierten Auszügen der Gesamt-ptDNA von ca. 200 Pflanzen zwischen 0,05% und 0,5%. Hätte der Anteil über 0,5% gelegen, so wäre das für E.montanum spezifische Fragment bereits bei der Fragmentmusteranalyse im UV-Licht identifizierbar gewesen (vgl. 3.4.4.1). Da nur in einer der zehn untersuchten Gruppen von je 200 Pflanzen paternale ptDNA festgestellt wurde, ist anzunehmen, daß es sich dabei nicht um einen in allen Pflanzen zu einem geringen Prozentsatz vorhandenen Anteil paternaler ptDNA handelte, sondern daß in der betreffenden Gruppe eine bzw. einige Pflanzen mit einem für Epilobium abnormen Plastidenerbgang auftraten.

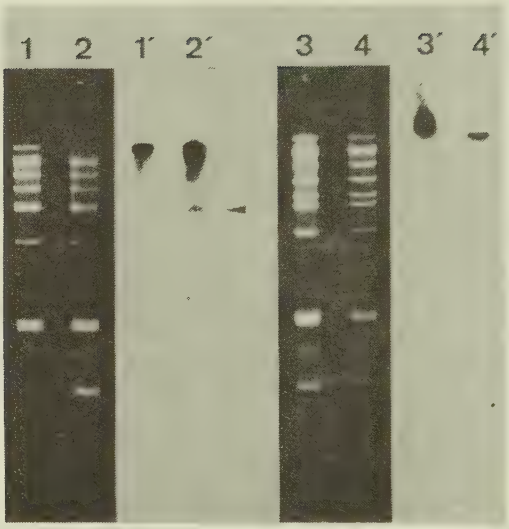


Abb. 26: Hybridisierung des radioaktiv markierten Fragments Ba 17 an Auszüge der Gesamt-ptDNA von je 200 Pflanzen der Kreuzung E.**watsonii** x E.**montanum** (Bahn 1 und 2) und E.**parviflorum** x E.**montanum** (Bahn 3 und 4). Die Autoradiographien zeigen in allen Fällen Signale mit dem für die maternale ptDNA spezifischen Fragment P 1. In Bahn 2 tritt zusätzlich mit dem für die paternale ptDNA spezifischen Fragment P 9, das auf dem Agarosegel (0,7%) nicht sichtbar ist, ein schwaches Signal auf (Pfeil).

4 DISKUSSION

Primäres Ziel der Arbeit war eine Analyse des Plastidenerbgangs bei **Epilobium**, die sowohl spezielle Aspekte der Plastidenvererbung dieser Onagraceen-Gattung als auch prinzipielle Fragen zu den methodischen Möglichkeiten und Grenzen der Untersuchung des Erbgangs plasmatischer Erbträger aufzeigen sollte. Ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Charakterisierung einiger **Epilobium**-Plastome und ihrer vergleichenden Betrachtung. Diese Untersuchungen sind einerseits im Hinblick auf den Plastidenerbgang wichtig, da unterschiedliche Plastome aufgrund von Plastom-Genom-Inkompatibilität einen veränderten Plastidenerbgang zeigen können (z.B. bei **Oenothera**: Stubbe et al., 1978); andererseits ermöglichen sie Aussagen zur Frage der Variabilität des Plastoms innerhalb von Gattungen und Familien.

Für den intragenerischen Plastomvergleich wurden die durch sieben Restriktionsenzyme erzeugten Fragmentmuster der ptDNAs von zehn Arten untersucht; zum intergenerischen Plastomvergleich wurden physikalische und genetische Karten einiger Plastome erstellt.

Ein weiteres Ziel der Untersuchungen bestand darin, neue Ansatzpunkte für die Erfassung der plasmatischen Faktoren zu schaffen, die in interspezifischen Kreuzungen zu Reziprokenunterschieden führen. Für die Eingrenzung dieser Faktoren liefert die Kenntnis der genetischen Organisation der Plastiden und ihres Vererbungsmodus erste wesentliche Hinweise.

4.1 DIE ORGANISATION DER PLASTIDEN-DNA VON EPILOBIUM

Nachdem die ersten Arbeiten zur physikalischen und genetischen Kartierung von plastidärer DNA (Bedbrook & Bogorad, 1976; Herrmann et al., 1976; Rochaix, 1978) Aufschluß über die prinzipielle Organisation des genetischen Materials der Plastide gegeben hatten, standen in den folgenden Untersuchungen der plastidären DNA Fragen der Plastomevolution, d.h. der Abänderungen von Plastomen innerhalb verschiedener Ver-

wandtschaftskreise im Vordergrund (z.B. Gordon et al., 1982; Kung et al., 1982; Palmer & Zamir, 1982). Entsprechend wird die Plastomorganisation von Epilobium und die intragenerische Variation der Plastome vor allem im Vergleich zu Oenothera und anderen höheren Pflanzen erörtert.

Das ptDNA-Molekül von Epilobium entspricht mit einer segmentellen Anordnung von zwei invers duplizierten und zwei nicht-repetitiven Regionen dem im Pflanzenreich am weitesten verbreiteten Organisationstyp des Plastoms. Seine Größe von 155 kbp stellt einen mittleren Wert innerhalb der von 120 bis 180 kbp rangierenden Molekülgröße der ptDNA höherer Pflanzen dar (Whitfeld & Bottomley, 1983). Alle zehn untersuchten Arten haben eine einheitliche Molekülgröße, d.h., größere Deletionen oder Insertionen treten bei der ptDNA dieser Arten nicht auf. Dagegen zeigt die Verteilung der Erkennungssequenzen von sieben Restriktionsenzymen (Bam HI, Bgl I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Pvu II, Sal I) auf der ptDNA, daß die Plastome aller zehn Arten molekular differieren und einen unterschiedlichen Ähnlichkeitsgrad haben.

Das Ausmaß der Konservierung bzw. mutativen Veränderung der Schnittmuster dieser Enzyme, die insgesamt ca. 1% der ptDNA-Sequenz erkennen, gibt Hinweise auf die Plastomevolution (Kung et al., 1982; Palmer & Zamir, 1982). Der Computervergleich aller molekulargewichtsmäßig erfaßten Fragmente eines Plastoms mit den jeweiligen Fragmenten aller anderen Plastome führt zu der in Abb. 11 dargestellten Gruppierung der Plastome. Ein hoher Ähnlichkeitsgrad besteht zwischen den Plastomen taxonomisch und geographisch benachbarter Arten. So weichen die Plastome der eurasischen Arten E.parviflorum, E.lanceolatum, E.duriaei und E.montanum nur geringfügig voneinander ab. Sie haben mit den Vertretern nordamerikanischen Ursprungs E.coloratum, E.glandulosum, E.luteum und E.watsonii, sowie mit der eurasischen Art E.hirsutum und der neuseeländischen Art E.billardierianum deutlich weniger Gemeinsamkeiten als die betreffenden Arten untereinander.

Geographisch wären die beiden letzgenannten Arten allerdings in der Gruppe der eurasischen Vertreter zu erwarten gewesen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die betrachteten Erkennungssequenzen der eingesetzten Enzyme nur einen kleinen Ausschnitt der Gesamtsequenz der

ptDNA darstellen und daß auch konvergente Entwicklungen in geographisch entfernten Populationen möglich sind. Auch wenn Plastome mit einem hohen Ähnlichkeitskoeffizienten (z.B. die von **E.coloratum** und **E.glandulosum**) wahrscheinlich phylogenetisch enger verwandt sind als solche mit deutlich weniger Gemeinsamkeiten, soll Abb. 11 nicht als ein phylogenetisches Schema verstanden werden. Ein solches Schema der ptDNA-Evolution müßte einerseits Ursache und Ausmaß der für die Schnittmusterunterschiede verantwortlichen mutativen Ereignisse berücksichtigen; andererseits müßte neben der relativen Häufigkeit der jeweiligen Typen von ptDNA-Abänderungen auch die unterschiedliche Frequenz mutativer Ereignisse in verschiedenen Bereichen der zirkulären ptDNA in die entsprechenden Berechnungen einbezogen werden.

Wie vor allem bei **Oenothera** (Gordon et al., 1982), **Nicotiana** (Salts et al., 1984), **Brassica** (Palmer et al., 1983) und **Zea** (Bowman et al., 1983) gezeigt, geht der intragenerische Polymorphismus plastidärer DNA primär auf bestimmte, besonders häufig geänderte Molekülbereiche, sog. 'hot spots' zurück. Mutative Ereignisse treten auf der ptDNA besonders an den Grenzen der invers duplizierten Regionen zur großen nicht-repetitiven Region sowie jeweils zentral in den nicht-repetitiven Regionen auf. Interessanterweise stimmen die kartierten Schnittmusterunterschiede der **Epilobium**-Plastome weitgehend mit den Positionen dieser 'hot spots' überein. Zentral in den nicht-repetitiven Regionen liegt eine zusätzliche Pvu II-Schnittstelle zwischen den Fragmenten P 4 und P 9 von **E.montanum** und eine bei **E.watsonii** fehlende Pvu II-Schnittstelle zwischen den Fragmenten P 8 und P 14 von **E.lanceolatum**. Die einzige Abänderung im Sal I-Schnittmuster der zehn untersuchten **Epilobium**-Plastome tritt bei **E.watsonii** und **E.billardierianum** an der Grenze zwischen großer nicht-repetitiver Region und den inversen Duplikationen durch Verlust einer Erkennungssequenz auf. Es wird angenommen, daß der Mechanismus der 'copy correction', der die völlige Symmetrie der inversen Duplikationen garantiert und an ihrer Grenze lokalisiert ist (Myers et al., 1982), mit DNA-Brüchen einhergeht und diese Zonen zu 'hot spots' macht (Salts et al., 1984).

Die Ursache der molekularen Veränderungen, die im Einzelfall zum Verlust oder Gewinn einer Erkennungssequenz führen, läßt sich nur

durch vergleichende Sequenzierungen exakt klären. Selbst bei den kartierten Schnittmusterunterschieden läßt sich nicht sagen, ob Basensubstitutionen, Basenmethylierung (Bolen et al., 1982) oder sehr kleine Deletionen, Insertionen oder Inversionen (Salts et al., 1984) für den Verlust bzw. Gewinn einer Schnittstelle verantwortlich sind. Während Tassopulo & Kung (1984) Basensubstitutionen auf der ptDNA als häufigste Ursache für intragenerische Plastomvariation bei **Nicotiana** annehmen, zeigten Gordon et al. (1982), daß sich Plastomdifferenzen bei **Oenothera** überwiegend als Größendifferenzen zwischen Fragmenten gleicher Position manifestieren, so daß auf Deletionen bzw. Insertionen (oder Inversionen, in denen asymmetrisch die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzyms liegt) geschlossen werden kann. Auch die intergenerischen Plastomdifferenzen zwischen **Atriplex** und **Spinacia** sind überwiegend auf Deletions- bzw. Insertionsereignisse zurückzuführen (Palmer, 1982). Dagegen konnten beim Vergleich der 10 untersuchten **Epilobium**-Plastome keine größeren Deletions- bzw. Insertionsereignisse identifiziert werden.

Auffällig ist beim Vergleich der bei **Oenothera** und **Epilobium** kartierten Schnittstellen, daß bei diesen eng verwandten Gattungen innerhalb der Onagraceen weniger konservierte Erkennungssequenzen auf der ptDNA existieren, als z.B. bei Epilobium und der Chenopodiacee **Spinacia.** Auch die Positionen der sieben Gene, die in der vorliegenden Arbeit auf der ptDNA von Epilobium kartiert wurden, entsprechen nicht der Gen-Anordnung bei **Oenothera**, sondern spiegeln die Organisation der ptDNA von Spinat (Herrmann et al., 1980b, 1983; Alt et al., 1983; Westhoff et al., 1983) und damit diejenige der meisten höheren Pflanzen wider. Eine 45 bis 50 kbp große Inversion innerhalb der großen nicht-repetitiven Region, die die veränderte Genanordnung auf der ptDNA von Oenothera bedingt (Herrmann et al., 1983) und sonst nur noch bei **Vigna** (Fabaceae) gefunden wurde (Palmer & Thomson, 1981, 1982), tritt bei Epilobium trotz seiner engen phylogenetischen Beziehung zu **Oenothera** nicht auf. Die Daten der Genkartierung deuten vielmehr darauf hin, daß es sich bei dieser Inversion um ein innerhalb der Onagraceen für **Oenothera** spezifisches Ereignis der Plastomevolution handelt und daß die Oenothera-Plastome möglicherweise eine schon relativ lange eigenständige Evolution durchmachen konnten.

4.2 DER PLASTIDENERBGANG IN DER GATTUNG EPILOBIUM

Die Diskussion der Untersuchungsergebnisse zum Plastidenerbgang von **Epilobium** wird im folgenden Abschnitt so strukturiert, daß zunächst anhand von Beispielen aus der Literatur die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Plastidenerbgangs erörtert werden, um auf dieser Grundlage anschließend die eigenen Ergebnisse kritisch abwägen zu können.

Historisch betrachtet gibt es bei der Erforschung der Plastidenvererbung im Pflanzenreich zwei prinzipielle Techniken, die ursprünglich aus der Cytogenetik stammen und im Zuge methodischer Innovation verschiedene Modifikationen erfahren haben:

1. Kreuzungsexperimente mit unterscheidbaren Plastidentypen
2. Mikroskopische Untersuchungen von Scheckungsmustern sowie der Spermatogenese und des Befruchtungsvorgangs.

Während in älteren Arbeiten phänotypisch unterscheidbare (grüne und weiße) Plastiden in Kreuzungsexperimenten oder lichtmikroskopische Verfahren z.B. zur Untersuchung der Zygotenbildung bei Algen angewandt wurden, stehen in neueren Arbeiten elektronenmikroskopische Analysen der Spermatogenese oder Kreuzungsexperimente mit genotypisch charakterisierten Plastiden im Vordergrund. Als genetische Marker dienten z.B. plastidäre Antibiotikaresistenzen (bei **Chlamydomonas**: Sager & Ramanis, 1976a; Harris et al., 1977; bei **Nicotiana**: Maliga et al., 1973, 1975; Umiel & Goldner, 1976) und Fragmentmuster der ptDNAs (bei **Nicotiana**: Belliard et al., 1978; Frankel et al., 1979; bei **Oenothera**: Alt et al., 1982). Nur in wenigen Fällen wurden Untersuchungen mit kombinierten Techniken für einzelne Gattungen (z.B. Chlamydomonas, Nicotiana, **Oenothera**) angewendet, so daß für diese ein umfassendes Bild der für den Plastidenerbgang relevanten Prozesse vorliegt.

In mehreren Arbeiten, die sich auf die Anwendung einer einzigen Methode beschränken, wird die Aussagekraft der mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse überschätzt. Sowohl für kreuzungsgenetische Arbeiten als auch für elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen sich

diesbezüglich Beispiele nennen. So schließen Cresti et al. (1983) aus ultrastrukturellen Untersuchungen der generativen Zelle von Oenothera organensis auf einen rein maternalen Plastidenerbgang bei dieser Art. Diese Aussage erscheint aufgrund des (für eine statistische Auswertung) geringen Materials, das bei der ultrastrukturellen Analyse eingesetzt werden kann und konträrer Befunde aus Kreuzungsexperimenten (Stubbe, 1984) als voreilig. Aus elektronenmikroskopischen Daten zum Verlauf der Spermatogenese sollte nicht unmittelbar auf den Plastidenerbgang geschlossen werden, denn bei der Identifizierung von Plastiden in der generativen Zelle oder den Spermazellen kann immer noch eine Eliminierung der paternalen Organellen in einem späteren Entwicklungsstadium (z.B. bei der Zygotenbildung oder während der frühen Embryogenese: Stubbe et al., 1978) stattfinden. Findet man dagegen keine Plastiden in den männlichen Gameten, so kann dieser Befund mit dem beschränkten Ausschnitt des elektronenmikroskopisch untersuchten Materials zusammenhängen. Eine solche Untersuchung kann seltene Ereignisse bezüglich des Plastidenerbgangs, die in der zeitlichen Dimension der Evolution keineswegs als selten einzustufen sind, nicht zureichend erfassen. Sie kann aber, sofern parallele kreuzungsgenetische Untersuchungen vorliegen, deren Ergebnisse erklären und stützen, indem sie z.B. Prozeß und Zeitpunkt der Eliminierung der Plastiden eines Elters beschreibt.

Die an den kreuzungsgenetischen Befund eines maternalen Plastidenerbgangs bei **Epilobium** angeschlossenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Spermatogenese zeigten, daß der Ausschluß paternaler Plastiden vom Erbgeschehen kein zufälliger Vorgang, sondern die Folge interner regulativer Prozesse des männlichen Gametophyten ist. Während sich in der generativen Zelle Proplastiden und Mitochondrien nachweisen lassen, sind in den Spermazellen nur noch Mitochondrien identifizierbar. Die Proplastiden der Spermazellen degenerieren und werden in Verdauungsvakuolen aufgelöst. Eine Degeneration paternaler Organellen während der Spermatogenese ist für verschiedene Vertreter des Pflanzenreichs, z.B. **Solanum** (Clauhs & Grun, 1977) und Lycopodium (Pettitt, 1978) beschrieben worden. Clauhs und Grun postulieren einen plasmatischen Letalfaktor, der zur Degeneration paternaler Plastiden

führen soll. Solange ein solcher Faktor nicht identifiziert ist, liefert dieses Postulat keinen Beitrag zum besseren Verständnis der Plastidendegeneration. Beim bisherigen Kenntnisstand kann lediglich angenommen werden, daß am Abbau der Plastiden lytische Enzyme aus Verdauungsvakuolen beteiligt sind.

Wie das Beispiel Chlamydomonas zeigt, kann ein Abbau paternaler Plastiden auch noch nach der Fusion der Gameten erfolgen. Bei dieser Alge degeneriert der vom mt^--Elter in die Zygote gebrachte Chloroplast (Sager & Lane, 1972; Burton et al., 1979). Bei Angiospermen mit maternalem Plastidenerbgang findet die Eliminierung paternaler Plastiden überwiegend in zwei Stadien der Entwicklung des männlichen Gametophyten statt: entweder bei der Teilung der Mikrospore in vegetative und generative Zelle (die generative Zelle erhält keine Plastiden) oder kurz vor bzw. nach der Teilung der generativen Zelle in die beiden Spermazellen (die Plastiden degenerieren in den Gameten) (Tilney-Bassett, 1978; Hagemann, 1979; Sears, 1980). Wie das Beispiel Castilleia zeigt, können sich verschiedene Arten einer Gattung hinsichtlich des Vorkommens von Plastiden in der generativen Zelle unterscheiden (Jensen et al., 1974). Während bei **Castilleia foliosa** die generative Zelle keine Plastiden enthält, sind sie in der generativen Zelle von **Castilleia wightii** eindeutig identifizierbar. Von den positiven Befunden bezüglich des Vorkommens von Plastiden in den generativen Zellen von **E.hirsutum** und **E.parviflorum** kann daher nicht auf andere Arten der Gattung Epilobium extrapoliert werden. Auch die Degeneration von Plastiden in den Spermazellen könnte artspezifisch variieren.

Zur Frage der Häufigkeit und des Ausmaßes einer rein maternalen Plastidenübertragung bei **Epilobium** können Kreuzungsexperimente zwischen Individuen mit unterscheidbaren Plastiden beitragen.

Bei der kreuzungsgenetischen Analyse des Plastidenerbgangs mit grün-weiß gescheckten Pflanzen können verschiedene methodische Schwierigkeiten auftreten. Einerseits muß in Kreuzungsexperimenten mit mutierten Plastiden berücksichtigt werden, daß deren Teilungsaktivität und Vitalität verändert sein könnten. In der Kreuzung grüner weiblicher mit weißen männlichen Eltern (g x w) können die mutierten paternalen Plastiden, sofern sie in die Zygote gelangen, von den zahlen-

mäßig und ernährungsphysiologisch überlegenen Plastiden der Eizelle nach wenigen Zellteilungsfolgen verdrängt werden. Eine phänotypische Identifizierung der wenigen weißen Plastiden wäre in späteren Entwicklungsstadien dann kaum noch möglich.

Andererseits wird die Aussagekraft der Ergebnisse der Kreuzung g x w dann fragwürdig, wenn der Prozentsatz gescheckter Nachkommen nahe der spontanen Mutationsrate von Plastiden liegt. P. Michaelis (1958) deutet die geringe Zahl gescheckter Nachkommen einer solchen Kreuzung von E.hirsutum-Pflanzen als durch spontane Mutation entstanden. Dadurch, daß er sich für diese Interpretationsmöglichkeit (gegenüber einer seltenen Transmission paternaler Plastiden) entscheidet, klärt er nicht die Herkunft der Schecken oder die Frage, ob bei **Epilobium** in seltenen Fällen ein biparentaler Plastidenerbgang vorkommt. Die im Laufe der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit gescheckten Pflanzen konzentrierten sich wegen dieser Problematik auf Kreuzungen zwischen rein weißen weiblichen und normalgrünen männlichen Eltern (w x g). Bei dieser Kreuzung sollten die ergrünungsfähigen paternalen Plastiden im Vorteil gegenüber den mütterlichen sein.

Während von P. Michaelis in der Kreuzung w x g nur rein weiße Nachkommen gefunden wurden, traten in den vorliegenden Untersuchungen einer über doppelt so großen Nachkommenschaft einer entsprechenden Kreuzung zu 0,8% rein grüne Pflanzen und zu 99,2% rein weiße Pflanzen auf. Dieser Befund ist überraschend, weil als Folge seltener biparentaler Plastidenvererbung in dieser Kreuzung gescheckte Nachkommen zu erwarten wären, denn die Eizellen enthalten wesentlich mehr Plastiden als die Spermazellen. Wie bereits in 3.2 dargestellt, wird die Möglichkeit, daß die grünen Nachkommen ihre Chloroplasten aus ergrünungsfähigen Proplastiden der Eizelle von Blüten weißer Seitenzweige erhalten, durch das Ergebnis der Kreuzung w x w, die nur weiße Nachkommen liefert, unwahrscheinlich gemacht. Trotzdem wäre es denkbar, daß durch seltene periklinale Teilungen in der ersten Tunikaschicht des Vegetationskegels die Anlagen eines Fruchtblattes ausnahmsweise aus dieser Schicht hervorgegangen und dadurch einige Eizellen mit ergrünungsfähigen Plastiden entstanden sind. Die im Kontext der vorliegenden Kreuzungsergebnisse wahrscheinlichere Deutung geht von einer seltenen

Übertragung paternaler Plastiden in die Eizelle aus, wobei die Frage nach den Ursachen einer Verdrängung der großen Zahl mutierter Eizellenplastiden ungeklärt bleibt.

Während Kreuzungsexperimente mit gescheckten Pflanzen neben den erörterten Schwierigkeiten auf Arten beschränkt bleiben, von denen Pflanzen mit mutierten Plastiden verfügbar sind (bei Epilobium wurde der Plastidenerbgang bisher nur mit E.hirsutum-Schecken untersucht), ermöglicht die Kombination interspezifischer Kreuzungen normal grüner Pflanzen mit einer molekulargenetischen Analyse der Plastiden der Eltern und der Nachkommenschaft die Untersuchung eines breiten Spektrums von Arten hinsichtlich des Plastidenerbgangs. Im Gegensatz zur Gattung Oenothera, in der Plastome kreuzungsgenetisch unterscheidbar sind (Stubbe, 1959), kann bei Epilobium erst durch die molekulargenetische Charakterisierung verschiedener ptDNAs der Erbgang definierter Plastome in verschiedenen Genom-Plastom-Kombinationen untersucht werden.

Die Analyse der ptDNA von Epilobium-Artbastarden, deren Eltern artspezifische ptDNA-Fragmentmuster besitzen, zeigte, daß bei allen untersuchten Epilobium-Arten (s. 3.4.4) zu über 99% maternale Plastiden an die Nachkommenschaft weitergegeben werden. Dieses Ergebnis macht es wahrscheinlich, daß eine Plastidendegeneration während der Spermatogenese nicht auf die beiden elektronenmikroskopisch untersuchten Arten beschränkt ist.

Durch Genom-Plastom-Inkompatibilität bedingte Veränderungen des Plastidenerbgangs, die von Oenothera bekannt sind (Stubbe et al., 1978), traten in den untersuchten interspezifischen Bastarden von Epilobium nicht auf. Diese Aussage gilt im Rahmen der Nachweisgrenzen der eingesetzten Methoden, die in 3.4.4.1 und 3.4.4.2 bestimmt wurden.

Die Hybridisierung artspezifischer radioaktiv markierter Fragmente der ptDNA (Nachweisgrenze für paternale ptDNA ca. 0,05%) an Auszüge der Gesamt-ptDNA von ca. 200 Jungpflanzen von 1 cm bis 10 cm Größe führte in keinem der untersuchten Fälle zur Identifizierung paternaler ptDNA. Demnach kann zur Erklärung der Tatsache, daß in adulten Pflanzen nur noch maternale Plastiden nachweisbar sind, nicht das Argument angeführt werden, daß paternale Plastiden zwar stets zu einem gewissen Prozentsatz in der Nachkommenschaft vorhanden sind, aber aufgrund

frühzeitiger Entmischung unerkannt bleiben. Offenbar arbeitet der Mechanismus zur Eliminierung paternaler Plastiden aus den Spermazellen mit hoher Präzision.

Dieser Befund wirft die im Rahmen der Plastomevolution interessante Frage auf, ob auch in einer großen Nachkommenschaft nur maternale Plastiden vorhanden sind. Die Analyse der ptDNA von 2000 Arthybriden in Gruppen zu je 200 ergab beim Vergleich der Fragmentmuster der elterlichen ptDNAs mit denjenigen der Nachkommenschaft einen rein maternalen Erbgang der ptDNA. Bei Verwendung radioaktiver Sonden, die mit Fragmenten artspezifischer Molekülgröße hybridisieren, trat jedoch in einer Gruppe neben dem für die maternale ptDNA spezifischen Signal ein für die paternale ptDNA spezifisches Signal auf. In dieser Nachkommenschaft befanden sich demnach zwischen 0,05% und 0,5% paternaler ptDNA (s. 3.4.4).

Offenbar traten in einer oder einigen Pflanzen der betreffenden Gruppe Artbastarde mit einem für **Epilobium** abnormen Plastidenerbgang auf. Die Spermazellen, die an der Bildung dieser Pflanzen beteiligt waren, müssen noch Plastiden enthalten haben, d.h., der Mechnismus zur Eliminierug paternaler Plastiden aus den Gameten war in diesem Fall (diesen Fällen) inaktiv. Dieser Befund steht in Einklang mit der These von Hagemann (1979), daß Mechanismen zur Eliminierung paternaler Plastiden nicht mit absoluter Zuverlässigkeit arbeiten. Wie bei **Antirrhinum** aufgrund von kreuzungsgenetischen Untersuchungen bereits postuliert (Diers, 1967), kommen den vorliegenden Untersuchungen zufolge seltene Fälle einer paternalen Plastidentransmission auch bei Pflanzen vor, deren Plastidenerbgang als maternal gilt. Der Mechanismus zur Eliminierung paternaler Plastiden arbeitet bei Epilobium zwar mit einer Effektivität von über 99%, doch treten in einer großen Nachkommenschaft vereinzelt Pflanzen auf, die auch paternale Plastiden enthalten. Bei evolutionstheoretischen Betrachtungen ist es wichtig, diese Möglichkeit biparentaler Plastidentransmission zu berücksichtigen, denn sie kann die Voraussetzungen für die Rekombination zwischen verschiedenen Plastomen schaffen (Grun, 1976).

Eine Rekombination zwischen den ptDNAs zweier Individuen ist bisher allerdings nur bei Chlamydomonas gefunden worden (Sager & Ramanis,

1976b; Harris et al., 1977). Sie geht mit einer Fusion der Plastiden einher, einem Vorgang, der in zahlreichen Algengruppen bekannt ist (Crawley, 1966; Cavalier-Smith, 1970, 1976; Calvayrac & Lefort-Tran, 1976), der aber bei höheren Pflanzen bisher nicht in vivo bewiesen werden konnte. Die Befunde von Esau (1972) bei **Mimosa** und von Possingham (1976) bei Spinat deuten zwar darauf hin, daß auch die Plastiden höherer Pflanzen fusionieren können, jedoch ist die Unterscheidung zwischen in-Teilung-begriffenen und fusionierenden Plastiden nur schwer möglich. Umfangreiche kreuzungsgenetische Untersuchungen mit Plastommutanten von Oenothera (Kutzelnigg & Stubbe, 1974; Sears, B., im Druck), lieferten keine Hinweise auf eine Plastidenfusion oder Rekombination plastidärer DNAs. Im Vergleich zu den Mitochondrien, die häufig fusionieren und deren DNAs sowohl bei Pilzen als auch bei höheren Pflanzen rekombinieren (Belliard et al., 1979), sind die Plastiden strukturell und genetisch weniger flexibel. Die weite Verbreitung uniparentaler Plastidenvererbung im Pflanzenreich und die konservative Organisation der ptDNA höherer Pflanzen legen den Schluß nahe, daß rekombinative Vorgänge zwischen den ptDNAs verschiedener Individuen äußerst seltene Ereignisse sind.

Zur Erklärung der Vorteile einer uniparentalen Plastidenvererbung und der konservativen Plastomstruktur weisen verschiedene Autoren auf die fein abgestimmte Interaktion zwischen Plastiden und Zellkern hin; diese komplexe Interaktion könnte durch biparentale Plastidenvererbung oder Rekombination der plastidären DNAs gestört werden (Sager, 1965; Chen et al., 1976; Grun, 1976). Dem ist entgegenzuhalten, daß die Interaktion mit dem Zellkern auch bei biparentaler Plastidenvererbung - die bei etwa einem Fünftel der bisher untersuchten Pflanzen auftritt (Sears, 1980) - funktioniert und daß die Mitochondrien ihre komplexe Interaktion mit dem Zellkern aufrecht erhalten, obwohl die Mitochondrien-DNA im Vergleich zur plastidären DNA durch größere Sequenzvariabilität (Palmer & Zamir, 1982) und häufige Rekombination charakterisiert ist.

4.3 DIE FRAGE DER BEDEUTUNG DES PLASTOMS FÜR DIE ENTWICKLUNGSSTÖRUNGEN VON EPILOBIUM-ARTBASTARDEN

Kreuzungsexperimente in Verbindung mit der Charakterisierung des Erbgangs und der genetischen Organisation plasmatischer Erbträger ermöglichen die Identifizierung von Teilfunktionen der Organellen bei morphogenetischen und entwicklungsphysiologischen Prozessen. Darüber hinaus schaffen sie die Voraussetzungen für das Verständnis der komplexen Kooperation der drei genetischen Kompartimente der Pflanzenzelle. Dort, wo eine gestörte Kooperation zwischen Zellkern und Plastiden bzw. Mitochondrien an phänotypischen Defekten augenfällig wird, sind erste Anhaltspunkte für die Aufklärung der Mechanismen des genetischen Zusammenspiels gegeben. So sind die bei Oenothera als Bastardbleichheit beschriebenen Chlorophylldefekte bestimmter inkompatibler Genom-Plastom-Kombinationen (Stubbe, 1959) wahrscheinlich auf die gestörte Kooperation von Zellkern und Plastide bei der gemeinsamen Synthese von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran zurückzuführen (Herrmann, R.G., persönliche Mitteilung).

Da bei interspezifischen Kreuzungen von Epilobium derartige Defekte des Photosyntheseapparates nicht beobachtet wurden, kann man annehmen, daß in dieser Gattung ein größeres Toleranzspektrum bei der Kombination nukleärer und plastidärer genetischer Faktoren existiert.

Bei den plasmatisch beeinflußten Entwicklungsstörungen (Wuchsstörungen und Pollensterilität) der untersuchten interspezifischen Bastarde scheinen eher die Mitochondrien als die Plastiden eine Rolle zu spielen. Diese Hypothese stützt sich auf die Tatsache, daß in wuchsgestörten sowie in pollensterilen Artbastarden von Epilobium keine Abweichungen vom Modus des maternalen Plastidenerbgangs gefunden wurden. Die mit verschiedenen Restriktionsenzymen getesteten ptDNAs wuchsgestörter Bastarde von **E.hirsutum** x **E.watsonii**[8] sowie der jeweils reziproken Bastarde von Kreuzungen zwischen E.watsonii x E.parviflorum und E.watsonii x **E.lanceolatum** zeigen stets das gleiche Schnittmuster wie die ptDNAs der mütterlichen Pflanzen. Das gleiche gilt für die pol-

[8] die reziproken Bastarde sind letal bzw. so klein, daß sie nicht genügend Material für eine Plastidenisolation liefern.

lensterilen Artbastarde **E.hirsutum** x **E.montanum** und **E.parviflorum** x **E.montanum**. Eine Beteiligung der Plastiden an der Auslösung von Wuchsstörungen und Pollensterilität kann zwar aufgrund dieser Befunde nicht ausgeschlossen werden, jedoch stützen auch die wenigen Veröffentlichungen, in denen cytoplasmatische Pollensterilität mit den Plastiden in Verbindung gebracht werden konnte, die oben genannte Hypothese. Bei **Nicotiana**-Arthybriden zeigte die Fragmentmusteranalyse der ptDNA, daß in der Nachkommenschaft cytoplasmatisch steriler Linien Fragmentmuster auftraten, die von denjenigen beider Eltern verschieden waren, während ptDNA-Fragmentmuster normaler Linien stets maternal vererbt wurden (Kung et al., 1981). Auch die Untersuchungen von Chen et al. (1975) zeigten, daß das Plastom pollensteriler **Nicotiana**-Sippen gegenüber dem normaler Sippen oft abgeändert ist. Die Ursachen dieses Phänomens sind bisher nicht geklärt. In den meisten Fällen wurde aber bisher die cytoplasmatische Pollensterilität eindeutig mit veränderten Schnittmustern der Mitochondrien-DNA (Pring & Levings, 1978; Belliard et al., 1979; Powling, 1982; Vedel & Mathieu, 1983) bzw. mit kleinen plasmidartigen DNA-Stücken (Levings et al., 1980; Dixon & Leaver, 1982; Pring et al., 1982; Powling & Ellis, 1983), die neben der Haupt-Mitochondrien-DNA auftreten, korreliert.

Während die Kreuzungen, in denen bei **Epilobium** Pollensterilität auftritt, sowohl in der ersten Filialgeneration als auch in den Rückkreuzungen eine rein maternale Vererbung dieses Merkmals zeigen, sind die Verhältnisse in Kreuzungen, die zu wuchsgestörten Nachkommen führen, komplizierter. Wie bereits in 3.1.2 erörtert, sind die Ergebnise der Kreuzungen und Rückkreuzungen, in denen wuchsgestörte Pflanzen auftreten, nicht allein auf nukleäre Erbfaktoren zurückführbar. Dieser Befund findet seine Parallelen in den von P. Michaelis beschriebenen plasmatisch bedingten Wuchsstörungen interspezifischer Bastarde von **E.hirsutum**(Jena) mit **E.parviflorum**(Tübingen) und **E.montanum**(Jena) (Michaelis & Wertz, 1935; Michaelis, 1951, 1962). Bei reziproken Kreuzungen dieser Arten waren die Nachkommen hinsichtlich des Auftretens von Wuchsstörungen verschieden.

Die Tatsache, daß in Kreuzungen mit **E.watsonii** als Mutter die Wuchsstörungen zwar quantitativ und qualitativ deutlich gegenüber der

reziproken Kreuzung erhöht sind, aber auch in dieser Kreuzung auftreten, deutet darauf hin, daß ein rein maternal vererbter plasmatischer Faktor nicht allein für die Auslösung der Wuchsstörungen verantwortlich sein kann. Vor allem in der Rückkreuzung E.watsonii x E.(hirsutum x watsonii), in der E.watsonii die Eizellen liefert, wären mehr wuchsgestörte Nachkommen als in der reziproken Rückkreuzung zu erwarten, wenn es sich um ein maternal vererbtes, cytoplasmatisch bedingtes Merkmal handeln sollte. Da die reziproken Rückkreuzungsbastarde nicht verschieden sind und durchweg abgeschwächte Wuchsstörungen zeigen, die sich im Verlauf der Ontogenie ganz auswachsen können, ist für eine vorläufige Interpretation des Phänomens ein biparental vererbbarer plasmatischer Faktor, der im Verlauf der Ontogenie entmischt werden kann, in Betracht zu ziehen. Das unterschiedliche Ausmaß der Wuchsstörungen in verschiedenen interspezifischen Kreuzungen mit E.watsonii könnte auf das unterschiedliche Harmonieren des betreffenden plasmatischen Faktors mit artspezifischen nukleären Faktoren zurückzuführen sein.

Aufgrund der Analyse des Plastidenerbgangs und der Plastome wuchsgestörter Bastarde kann bisher lediglich gefolgert werden, daß das Plastom bei der Auslösung der Wuchsstörungen wahrscheinlich keine Rolle spielt. Auch die von Stubbe (1970) bei Oenothera als falcifolia-Syndrom beschriebenen Entwicklungsstörungen, die in ihrem ungewöhnlichen Vererbungsmodus gewisse Parallelen zu den beschriebenen Wuchsstörungen von Epilobium zeigen, sind durch plasmatische Faktoren zumindest teilweise verursacht, aber wahrscheinlich nicht plastidär bedingt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit behandelt die plasmatische Vererbung bei Epilobium, insbesondere die Plastidenvererbung und die Organisation des Plastoms (Gesamtheit des in den Plastiden lokalisierten Erbmaterials). Die molekulargenetische Analyse desselben wurde mit Kreuzungsexperimenten verknüpft, um die Rolle des Plastoms bei der Auslösung von Reziprokenunterschieden in Epilobium-Artbastarden beurteilen zu können.

Die Charakterisierung der Plastome von 10 Epilobium-Arten anhand der durch 7 Restriktionsenzyme erzeugten Fragmentmuster der Plastiden-DNA (ptDNA) zeigte, daß jede Spezies ein artspezifisches Plastom hat. Ein hoher Ähnlichkeitsgrad wurde zwischen Plastomen taxonomisch und geographisch benachbarter Arten gefunden.

Für die Erkennungssequenzen von drei Restriktionsenzymen (Bgl I, Pvu II, Sal I) wurden physikalische Karten der Plastome aller 10 Arten erstellt. Dabei zeigte sich, daß das ptDNA-Molekül von Epilobium mit einer segmentellen Anordnung von zwei invers duplizierten und zwei nicht-repetitiven Regionen dem im Pflanzenreich am weitesten verbreiteten Organisationstyp des Plastoms entspricht. Der intragenerische Polymorphismus der ptDNA von Epilobium ist wie bei Oenothera und Nicotiana primär auf bestimmte, besonders häufig geänderte Molekülbereiche, sog. "hot spots", zurückzuführen.

In heterologen Hybridisierungsexperimenten mit radioaktiv markierten Gensonden der ptDNA von Spinat wurden 7 Gene auf der ptDNA von Epilobium lokalisiert. Daran codieren 6 Gene für Polypeptide von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran und ein Gen für die große Untereinheit des Stromaproteins Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase/Oxygenase. Die Anordnung plastidärer Gene weicht bei Epilobium von derjenigen bei Oenothera, einer eng verwandten Gattung, deutlich ab. Eine Inversion innerhalb der großen nicht-repetitiven Region der ptDNA tritt im Gegensatz zu Oenothera bei Epilobium nicht auf.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der mit drei verschiedenen methodischen Ansätzen durchgeführten Analyse des Plastidenerbgangs. In reziproken Kreuzungen zwischen grünen und weißen bzw. gescheckten Pflanzen wurde bestätigt, daß der Plastidenerbgang überwiegend maternal ist.

Zur Untersuchung der Ursachen für den Ausschluß paternaler Plastiden vom Erbgeschehen wurde der männliche Gametophyt von **Epilobium** elektronenmikroskopisch untersucht. Ultradünne Serienschnitte der generativen Zelle und der Spermazellen von **Epilobium** zeigten, daß die in der generativen Zelle vorhandenen Plastiden nach der Teilung derselben in die zwei Spermazellen degenerieren, während die Mitochondrien intakt bleiben.

Zur Klärung der Frage nach der Genauigkeit, mit der der Mechanismus zur Eliminierung paternaler Plastiden aus den Spermazellen arbeitet, wurden kombinierte kreuzungs- und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die ptDNA aus 12 verschiedenen Artbastarden isoliert, deren Eltern jeweils artspezifische ptDNA-Fragmentmuster hatten. Der Vergleich der ptDNAs von Parental- und Filialgenerationen ließ in allen Fällen (selbst bei der Analyse der ptDNA aus Einzelpflanzen, die phänotypisch in hohem Maße dem Vater ähnelten) auf einen maternalen Plastidenerbgang schließen. Um die Nachweisgrenze für paternale ptDNA (sie lag in den vorausgehenden Versuchen bei 0,5-3%) zu erweitern, wurden Teile von artspezifischen Fragmenten kloniert. Durch Hybridisierung radioaktiv markierter Fragmente an ptDNA-Fragmentmuster verschiedener Artbastarde wurde die Nachweisgrenze für paternale ptDNA auf ca. 0,1 - 0,05% erweitert.

Die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aus jeweils 50-100 Artbastarden einer Kreuzung isolierte ptDNA erwies sich bei Hybridisierung mit artspezifischen, radioaktiv markierten ptDNA-Fragmenten als maternal vererbt. Bei Ausdehnung der Analyse auf ca. 2000 Arthybride, die in Gruppen zu je 200 untersucht wurden, zeigte sich allerdings, daß in seltenen Fällen ($<0,5\%$) auch paternale ptDNA in der Nachkommenschaft auftritt.

Bei der phänotypischen Analyse von Bastarden aus 30 intra- und interspezifischen Kreuzungen traten Reziprokenunterschiede in Form von Pollensterilität und Wuchsstörungen auf. Da bei den untersuchten entwicklungsgestörten Bastarden keine Veränderungen innerhalb des Plastoms und keine Abweichungen vom Modus des Plastidenerbgangs festgestellt wurden, ist die Beteiligung mitochondrialer Erbträger an der Auslösung der plasmatisch bedingten Entwicklungsstörungen in Betracht zu ziehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, M.P., (1969)
"Differential staining of aborted and nonaborted pollen"
Stain Tech. 44:117-122.

Alt, J., Westhoff, P., Sears, B., Nelson, N., Hurt, E., Hauska, G., & Herrmann, R.G. (1983)
"Genes and transcripts for the polypeptides of Cytochrom $b_{6/f}$ complex from spinach thylakoid membranes"
EMBO J. 2:979-986.

Alt, J., Hachtel, W., & Schwemmle, B. (1982)
"Vererbung der Chloroplasten-DNA bei **Munzia-Oenotheren**"
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 95:281-289.

Alt, J., Winter, P., Sebald, W., Moser, J.G., Schedel, R., Westhoff, P., & Herrmann, R.G. (1983)
"Localization and nucleotide sequence of the gene for the ATP Synthase proteolipid subunit on the spinach plastid chromosome"
Curr. Gen. 7:129-138.

Arnold, C.G. (1963)
"Die Plastiden als Erbträger extraplastidaler Merkmale"
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 76:3-12.

Arrand, J.R., Myers, P.A., & Roberts, R.J. (1978)
"A new restriction endonuclease from **Streptomyces albus G**"
J. Mol. Biol. 118:127-135.

Bartels, F. (1964)
"Plastidenzählungen bei Epilobium hirsutum"
Planta 60:434-452.

Barton, N., & Jones, J.S. (1983)
"Mitochondrial DNA: new clues about evolution"
Nature 306:317.

Baur, E. (1909)
"Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der 'Varietates albomarginatae Hort' von **Pelargonium zonale**"
Z. ind. Abst. Vererb. 1:330-351.

Bedbrook, J.R. & Bogorad, L. (1976)
"Endonuclease recognition sites mapped on Zea mays chloroplast DNA"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:4309-4313.

Belliard, G., Pelletier, G., Vedel, F., & Quetier, F. (1978)
"Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of Nicotiana tabacum"
Molec. Gen. Genet. 165:231-237.

Belliard, G., Vedel, F., & Pelletier, G. (1979)
"Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of **Nicotiana tabacum** by protoplast fusion"
Nature 281:401-403.

Birnboim, H.C. & Doily, J. (1979)
"A rapid alcaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA"
Nucl. Ac. Res. 7:1513-1523.

Bolen, P.L., Grant, D.M., Swinton, D., Boynton, J.E. & Gillham, N.W. (1982)
"Extensive methylation of chloroplast DNA by a nuclear gene mutation does not affect chloroplast gene transmission in **Chlamydomonas**"
Cell 28:335-343.

Borkhardt, B. & Olson, L.W. (1983)
"Paternal inheritance of the mitochondrial DNA in interspecific crosses of the aquatic fungus **Allomyces**"
Curr. Gen. 7:403-404.

Bowmann, C.M., Bonnard, G., & Dyer, T.A. (1983)
"Chloroplast DNA variation between species of **Triticum** and **Aegilops**. Location of the variation on the chloroplast genome and its relevance to the inheritance and classification of the cytoplasm"
Theor. Appl. Genet. 65:247-262.

Burton, W.G., Grabowy, C.T., & Sager, R. (1979)
"Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in **Chlamydomonas**"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1390-1394.

Calvayrac, R. & Lefort-Tran, M. (1976)
"Organisation spatiale des chloroplastes chez Euglena à l'aide de coupes seriées semi-fine"
Protoplasma 89:353-358.

Cass, D.D. (1973)
"An ultrastructural and Nomarski-interference study of the sperms of barley"
Can. J. Bot. 51:601-609.

Cavalier-Smith,T. (1970)
"Electron microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of **Chlamydomonas reinhardtii**"
Nature (London) 228:333-335.

Cavalier-Smith, T. (1976)
"Electron microscopy of zygospore formation in Chlamydomonas **reinhardtii**"
Protoplasma 87:297-316.

Chen, K., Kung, S.D., Gray, J.C., & Wildman, S.G. (1975)
"Polypeptide compositon of Fraction I Protein from Nicotiana glauca and from cultivars of **Nicotiana tabacum**, including a male sterile line"
Biochem. Gen. 13:771-778.

Chen, K., Johal, S., & Wildman, S.G. (1976)
"Phenotypic markers for chloroplast DNA genes in higher plants and their use in biochemical genetics" In: 'Nucleic Acid and Protein Synthesis in Plants'(L. Bogorad & J. Weil, eds.), pp. 183-194,
Plenum, New York/London.

Clauhs, R.P. & Grun, P. (1977)
"Changes in plastid and mitochondrion content during maturation of generative cells of **Solanum** (Solanaceae).
Am. J. Bot. 64:377-383.

Correns, C. (1909)
"Vererbungsversuche mit blass (gelb) grünen und buntblättrigen Sippen bei **Mirabilis jalapa, Urtica pilulifera** and **Lunaria annua**"
Z. Vererbungsl. 1:291-329.

Crawley, J.C.W. (1966)
"Some observations on the fine structure of the gametes and zygotes of **Acetabularia**"
Planta 69:365-376.

Cresti, M., Ciampolini, F., & Kapil, R.N. (1983)
"Ultrastructure of S_3S_4 genotype pollen grains of **Oenothera organensis**"
Acta Bot. Neerl. 32:177-183.

Dagert, M. & Ehrlich, S.D. (1979)
"Prolonged incubation in Calciumchloride improves the competence of **Escherichia coli** cells"
Gene 6:23-28.

Dangeard, P.A. (1919)
"Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome"
C.r. Acad. Sci. Paris 169:1005.

de Heij, H.T., Lustig, H., Moeskops, D.J.M., Bovenberg, W.A., Bisanz, C., & Groot, G.S.P. (1983)
"Chloroplast DNAs of Spinacia, Petunia and Spirodelia have a similar gene organization"
Curr. Gen. 7:1-6.

Dente, L., Cesareni, G., & Cortese, R. (1983)
"pEMBL: a new family of single stranded plasmids"
Nucl. Ac. Res. 11:1645-1655.

Diers, L.A. (1967)
"Übertragung von Plastiden durch den Pollen bei Antirrhinum majus"
Molec. Gen. Genet. 100:56-62.

Dixon, L.K. & Leaver, C.J. (1982)
"Mitochondrial gene expression and cytoplasmic male sterility in Sorghum"
Plant Mol. Biol. 1:89-102.

Driesel, A.J., Speirs, J., & Bohnert, H.J. (1980)
"Spinach chloroplast mRNA for a 32,000 dalton polypeptide. Size and localization on the physical map of the chloroplast DNA"
Biochim. Biophys. Acta 610:297-310.

Dugaiczyck, A., Boyer, H.W., & Goodman, H.M. (1975)
"Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures"
J. Mol. Biol. 96:171-184.

Duncan, C.H., Wilson G.A., & Young, F.E. (1978)
"Biochemical and genetic properties of site-specific restriction endonucleases in **Bacillus globigii**"
J. Bacteriol. 134:338-344.

Ehrendorfer, F. (1983)
"Evolution and Systematik"
In: 'Lehrbuch der Botanik' (E. Strasburger, ed.)
Fischer, Stuttgart.

Esau, K. (1972)
"Apparent temporary chloroplast fusion in leaf cells of **Mimosa pudica**"
Z. Pflanzenphysiol. 67:244-254.

Geith, K. (1923)
"Experimentell-systematische Untersuchungen in der Gattung Epilobium L."
Bot. Arch. 6:123-186.

Gordon, K.H.J., Crouse, E.J., Bohnert, H.J. & Herrmann, R.G. (1981)
"Restriction endonuclease cleavage site map of chloroplast DNA from **Oenothera parviflora** (Euoenothera Plastome IV)"
Theor. Appl. Genet. 59:281-296.

Gordon, K.H.J., Crouse, E.J., Bohnert, H.J. & Herrmann, R.G. (1982)
"Physical mapping of differences in chloroplast DNA of the five wild-type plastomes in **Oenothera** subsection **Euoenothera**"
Theor. Appl. Genet. 61:373-384.

Grun, P. (1976)
"Cytoplasmic gentics and evolution"
Columbia Univ. Press, New York.

Hagemann, R. (1976)
"Plastid distribution and plastid competition in higher plants and the induction of plastome mutations by nitroso-urea-compounds"
In: 'Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria' (Th. Bücher, W. Neupert, W. Sebald, and S. Werner, eds.), pp. 331-338, Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam

Hagemann, R. (1979)
"Genetics and molecular biology of plastids of higher plants"
In: 'Stadler Symposium Vol. 11' (G. Redei, ed.), pp. 91-115, Missouri Agricultural Experiment Station.

Harris, E.H., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Tingle, C.L., & Fox, S.B. (1977)
"Mapping of chloroplast genes involved in chloroplast ribosome biogenesis in Chlamydomonas reinhardtii"
Molec. Gen. Genet. 155:249-266.

Heber, U. (1973)
"Stoichiometry of reduction and phosphorylation during illumination of intact chloroplasts"
Biochim. Biophys. Acta 305:140-152.

Herrmann, R.G. (1982)
"The preparation of circular DNA from plastids"
In: 'Methods in Chloroplast Molecular Biology' (M. Edelmann, R. Hallick, N.H. Chua, eds.), pp. 259-280, Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam.

Herrmann, R.G., Bohnert, H.J., Kowallik, K.V., & Schmitt, J.M. (1975)
"Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants"
Biochim. Biophys. Acta 378:305-317.

Herrmann, R.G., Bohnert, H.J., Driesel, A., & Hobom, G. (1976)
"The location of rRNA genes on the restriction endonuclease map of **Spinacia oleracea** chloroplast DNA"
In: 'Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria' (Th. Bücher, W. Neupart, W. Sebald, and S. Werner, eds.), pp. 351-359, Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam.

Herrmann, R.G., Palta, H.K., & Kowallik, K.V. (1980a)
"Chloroplast DNA from three archegoniates"
Planta 148:319-327.

Herrmann, R.G. Seyer, P., Schedel, R., Gordon, K., Bisanz, C., Winter, P., Hildebrandt, J.W., Wlaschek, M., Alt, J., Driesel, A.J., & Sears, B.B. (1980b)
"The plastid chromosomes of several dicotyledons"
In: 'Biological Chemistry of Organelle Formation' (Th. Bücher, W. Sebald, H. Weiss, eds.), pp. 97-112,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Herrmann, R.G., Whitfeld, P.R., & Bottomley, W. (1980c)
"Construction of a Sal I/Pst I restriction map of spinach chloroplast DNA using low-gelling-temperature agarose electrophoresis"
Gene 8:179-191.

Herrmann, R.G. & Whitfeld, P.R. (1981)
"Restriction mapping of chloroplast DNA using low-melting-temperature agarose" In: 'Methods in Chloroplast Molecular Biology' (M. Edelmann, R. Hallick, N.H. Chua, eds.) pp. 451-469
Elsevier/North Holland Press, Amsterdam.

Herrmann, R.G. Westhoff, P., Alt, J., Winter, P., Tittgen, J., Bisanz, C., Sears, B.B., Nelson, N., Hurt, E., Hauska, G., Viebrock, A., & Sebald, W. (1983)
"Identification and characterization of genes for polypeptides of the thylakoid membrane"
In: 'Structure and Fuction of Plant Genomes' (O. Cifferi, L. Dure, III, eds.), pp. 143-154,
Plenum Publ. Corp., New York/London.

Jensen, R.G. & Bassham, J.A. (1966)
"Photosynthesis by isolated chloroplasts"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:1095-1101.

Jensen, W.A. & Fischer, D.B. (1968)
"Cotton embryogenesis: The entrance and the discharge of the pollen tube in the embryo sac"
Planta (Berl.) 78:158-183.

Jensen, W.A., Ashton, M., & Heckard, L.R. (1974)
"Ultrastructural studies of the pollen of subtribe **Castilleiinae**, family Scrophulariaceae"
Bot. Gaz. 135:210-218.

Kahn, A., v. Wettstein, D. (1961)
"Macromolecular physiology of plastids II: Structure of isolated spinach chloroplasts"
J. Ultrastruct. Res. 5:557-574.

Kemble, R.J. & Mans, R.J. (1983)
"Examination of the mitochondrial genome of revertant progeny from S cms maize with cloned S-1 and S-2 hybridization probes"
J. Mol. Appl. Gen. 2:161-171.

Kolodner, R. & Tewari, K.K (1975)
"The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants"
Biochim. Biophys. Acta 402:372-384.

Kung, S.D., Zhu, Y.S., Chen, K., Shen, G.F., & Sisson, V.A. (1981)
"Nicotiana chloroplast genome II. Chloroplast DNA alteration"
Molec. Gen. Genet. 183:20-24.

Kung, S.D., Zhu, Y.S., & Shen, G.F. (1982)
"Nicotiana chloroplast genome III. Chloroplast DNA evolution"
Theor. Appl. Gen. 61:63-79.

Kutzelnigg, H. & Stubbe, W. (1974)
"Investigations on plastome mutants in Oenothera I. General considerations"
Subcell. Biochem. 3:73-89.

Laulhere, J.P. & Rozier, C. (1976)
"One step extraction of plant nucleic acids"
Plant Sci. Lett. 6:237-242.

Lawn, R.M., Fritsch, E.F., Parker, R.C., Blake, G., & Maniatis, T. (1978)
"The isolation and characterization of linked δ- and ß globin gene from a cloned library of human DNA"
Cell 15:1157-1174.

Levings, C.S., Kim, B.D., Pring, D.R., Conde, M.F., Mans, R.J., Laughnan, J.R., & Gabay-Laughnan, S.J. (1980)
"Cytoplasmic reversion of Cms-S in maize is associated with a transpositional event"
Science 209:1021-1023.

Luft, J.H. (1961)
"Improvements in epoxy resin embedding methods"
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9:409-414.

Maliga, P., Sz-Breznovits, A., & Marton, L. (1973)
"Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco"
Nature New Biol. 244:29-30.

Maliga, P., Sz-Breznovits, A., Joo, F., & Marton, L. (1975)
"Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria"
Nature (London) 255:401-402.

Mandel, M. & Higa, A. (1970)
"Calcium dependent bacteriophage infection"
J. Mol. Biol. 53:159-162.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1982)
"Molecular cloning"
Cold Spring Harbor Laboratory.

McDonnell, M.W., Simon, M.N., & Studier, F.W. (1977)
"Analysis of restriction fragments of T 7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alcaline gels"
J. Mol. Biol. 110:119-146.

Michaelis. P. (1929)
"Über den Einfluß von Kern und Plasma auf die Vererbung"
Biol. Zbl. 49:302-316.

Michaelis, P. (1931)
"Die Bedeutung des Plasmas für die Pollenfertilität reziprok verschiedener Epilobium-Bastarde"
Ber. Dtsch. Bot Ges. 49:96-104.

Michaelis, P. (1932)
"Über die Beziehung zwischen Kern und Plasma bei den reziprok verschiedenen Epilobium-Bastarden"
Z. Vererbungsl. 62:95-101.

Michaelis, P. (1935)
"Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an Epilobium III. Zur Frage der Übertragung von Pollenschlauchplasma in die Eizelle und ihre Bedeutung für die Plasmavererbung"
Planta 23:486-500.

Michaelis, P. (1940)
"Über reziprok verschiedene Sippenbastarde bei Epilobium hirsutum I. Die reziprok verschiedenen Bastarde der Epilobium-hirsutum-Sippe Jena"
Z. Vererbungsl. 78:187-222.

Michaelis, P. (1948)
"Über einige Abänderungen an reziprok verschiedenen Epilobium-hirsutum-Bastarden"
Z. Vererbungsl. 82:197-229.

Michaelis, P. (1950)
"Grundzüge der intraindividuellen Plasmon-Umkombination"
Protoplasma 39:260-274.

Michaelis, P. (1951)
"Plasmavererbung und Heterosis"
Z. Pflanzenzüchtung 30:250-275.

Michaelis, P. (1955)
"Modellversuche zur Plastiden- und Plasmavererbung"
Züchter 25:209-221.

Michaelis, P. (1958)
"Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden II. Teil"
Planta 51:722-756.

Michaelis, P. (1959)
"The genetical interactions between nucleus and cytoplasm in Epilobium"
Exp. Cell. Res., Supp VI, 1-9.

Michaelis, P. (1961)
"Genetische, entwicklungsgeschichtliche und zytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung"
Flora 151:162-201.

Michaelis, P. (1962a)
"Über gehäufte Plastidenabänderungen I"
Biol. Zbl. 81:91-128.

Michaelis, P. (1962b)
"Über Zahlengesetzmäßigkeiten plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden"
Protoplasma 55:177-231.

Michaelis, P. (1966)
"The sum of plasmone constituents and the plasmone analysis"
Nucleus 9:103-118.

Michaelis, P. (1967)
"The investigation of plasmone segregation by pattern analysis"
Nucleus 10:1-14.

Michaelis, P. & v. Dellinghausen, M. (1942)
"Über reziprok verschiedene Sippenbastarde bei **Epilobium hirsutum** IV. Weitere Untersuchungen über die genischen Grundlagen der extrem stark gestörten Bastarde der **E.hirsutum**-Sippe Jena"
Z.Vererbungsl. 80:373-428.

Michaelis, P. & Wertz, E. (1935)
"Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungn an Epilobium IV. Vergleichende Untersuchungen über das Plasmon von **Epilobium hirsutum**, E.luteum, E.montanum und E.roseum"
Z. Vererbungsl. 70:138-139.

Mosquin, T. (1968)
"Chromosome Translocations in Epilobium (Onagraceae)"
Can. J. Genet. Cytol. 10:794-798.

Myers, A.M., Grant, D.M., Rabert, D.K., Harris, E.H., Boynton, J.E., & Gillham, N.W. (1983)
"Mutants of Chlamydomonas reinhardtii with physical alterations in their chloroplast DNA"
Plasmid 7:133-151.

Palmer, J.D. (1982)
"Physical and gene mapping of chloroplast DNA from Atriplex **triangularis** and **Cucumis sativa**"
Nucl. Ac. Res. 10:1593-1605.

Palmer, J.D. (1983)
"Chloroplast DNA exists in two orientations"
Nature 301:92-93.

Palmer, J.D., Shields, C.R., Cohen, D.B., & Orton, T.J. (1983)
"Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid **Brassica** species"
Theor. Appl. Genet. 65:181-189.

Palmer, J.D. & Thompson, W.F. (1981)
"Rearrangements in the chloroplast genomes of mung bean and pea"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5533-5537.

Palmer, J.D. & Thompson, W.F. (1982a)
"Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost"
Cell 29:537-550.

Palmer, J.D. & Zamir, D. (1982b)
"Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in Lycopersicon"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5006-5010.

Pettitt, J.M. (1978)
"Regression and elimination of cytoplasmic organelles during meiosis in Lycopodium"
Grana 17:99-105.

Possingham, J.V. (1976)
"Controls to chloroplast division in higher plants"
J. Microsc. Biol. Cell 25:283-288.

Powling, A. (1982)
"Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugarbeet with normal and male-sterile cytoplasms"
Heredity 49:117-120.

Powling, A. & Ellis, T.H.N. (1983)
"Studies on the organelle genomes of sugarbeet with male-fertile and male-sterile cytoplasms"
Theor. Appl. Gen. 65:323-328.

Pring, D.R., Conde, M.F., Schertz, K.F., & Levings, C.S. (1982)
"Plasmid-like DNA species associated with mitochondria of cytoplasmic male sterile Sorghum"
Molec. Gen. Genet. 186:180-184.

Pring, D.R. & Levings, C.S. (1978)
"Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms"
Genetics 89:121-136.

Renner, O. (1924)
"Die Scheckung der Oenotherenbastarde"
Biol. Zbl. 44:309-336.

Renner, O. & Kupper W. (1921)
"Artkreuzungen in der Gattung **Epilobium**
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 39:201-206.
Reynolds, E. (1963)
"The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy"
J. Cell Biol. 17:208-212.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., & Berg, P. (1977)
"Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I"
J. Mol. Biol. 113:237-251.

Rochaix, J.D. (1978)
"Restriction endonuclease map of the chloroplast DNA of **Chlamydomonas reinhardtii**"
J. Mol. Biol. 126:597-617.

Russell, S.D. (1981)
"Ultrastructure of the sperms of Plumbago zeylanica 1. Cytology and association with the vegetative nucleus"
Protoplasma 107:85-108.

Rüther, U., Koenen, M., Otto, K., & Müller-Hill, B. (1981)
"pUR 222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA"
Nucl. Ac. Res. 9:4087-4098.

Sager, R. (1965)
"Mendelian and non-Mendelian heredity: A reappraisal"
Proc. Roy. Soc. Ser. B 164:290-297.

Sager, R. & Lane, D. (1972)
"Molecular basis of maternal inheritance"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2410-2413.

Sager, R. & Ramanis, Z. (1976a)
"Chloroplast genetics of Chlamydomonas I. Allelic segregation ratios"
Genetics 83:303-321.

Sager, R. & Ramanis, Z. (1976b)
"Chloroplast genetics of Chlamydomonas II. Mapping by co-segregation frequency analysis"
Genetics 83:323-340.

Salts, Y., Herrmann, R.G., Peleg, N., Lavi, U., Izhar, S., Frankel, R., & Beckmann, J.S. (1984)
"Mapping of divergent Nicotiana plastid DNAs"
Theor. Appl. Genet. 69:1-14.

Schiller, B., Herrmann, R.G., & Melchers, G. (1982)
"Restriction endonuclease analysis of plastid DNA from tomato, potato and some of their somatic hybrids"
Molec. Gen. Genet. 186:453-459.

Schmitz, U.K. (1979)
"Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pollenkörnern von Epilobium"
Staatsexamen, Universität Düsseldorf.

Schneider, V. & Hallier, U. (1970)
"Polyvinylpyrrolidone as protective substance against inhibition of enzyme systems caused by tannins"
Planta 94:134-139.

Sears, B. (1980)
"Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom"
Plasmid 4:233-255.

Seavey, S.R. & Raven, P.H. (1977)
"Chromosomal evolution in Epilobium sect. Epilobium (Onagraceae) I"
Plant. Syst. Evol. 127:107-120.

Seavey, S.R. & Raven, P.H. (1977)
"Chomosomal evolution in Epilobium sect. Epilobium (Onagraceae) II"
Plant. Syst. Evol. 128:195-200.

Seavey, S.R. & Raven, P.H. (1978)
"Chromosomal evolution in Epilobium sect. Epilobium (Onagraceae) III"
Plant. Syst. Evol. 130:79-84.

Simmonds, N.W. (1969)
"Variegated mutant plastid chimeras of potatoes"
Heredity 24:303-306.

Southern, E.M. (1975)
"Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis"
J. Mol. Biol. 98:503-517.

Spurr, A.R. (1969)
"A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy"
J. Ultrastruct. Res. 26:31-45.

Stafford, D.W. & Bieber, D. (1975)
"Concentration of DNA solutions by extraction with 2-butanol"
Biochim. Biophys. Acta 378:18-21.

Stubbe, W. (1959)
"Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei Oenothera"
Z. Vererbungsl. 90:288-298.

Stubbe, W. (1970)
"Das Falcifolia-Syndrom der Oenotheren"
Molec. Gen. Genet. 106:213-227.

Stubbe, W. (1984)
"Biparental plastid inheritance in Oenothera organensis Munz"
Acta Bot. Neerl. 33:229.

Stubbe, W., Pietsch, B., & Kowallik, K.V. (1978)
"Cytologische Untersuchungen über väterliche Plastidenvererbung und plastomabhängige Degeneration der Samenanlagen bei einem Oenothera-Bastard"
Biol. Zbl. 97:39-52.

Tassopulu, D. & Kung, S.D. (1984)
"Nicotiana chloroplast genome. 6. Deletion and hot spot - a proposed origin of the inverted repeats"
Theor. Appl. Gen. 67:185-193.

Tilney-Bassett, R.A.E. (1978)
"The inheritance and genetic behaviour of plastids"
In: 'The Plastids' (J.T.O. Kirk & R.A.E. Tilney-Bassett, eds.), pp. 251-524,
Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam.

Umiel, N. & Goldner, R. (1976)
"Effects of streptomycin on diploid tobacco callus cultures and the isolation of resistant mutants"
Protoplasma 89:83-89.

van Ee, J.H., Vos.Y.J., Bohnert, H.J., & Planta, R.J. (1982)
"Mapping of genes on the chloroplast DNA of Spirodela oligorhiza"
Pl. Mol. Biol. 1:117-131.

Vedel, F. & Mathieu, Ch. (1983)
"Physical and gene mapping of chloroplast DNA from normal and cytoplasmic male sterile (radish cytoplasm) lines of Brassica napus"
Curr. Genet. 7:13-20.

Vieira, J. & Messing J. (1982)
"The pUC plasmids, an M13 mp 7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers"
Gene (Amst.) 19:259-268

Wahl, G.M., Stern, M., & Stark, G.R. (1979)
"Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3683-3687.

Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., & Richardson, C.C. (1968)
"Enzymatic breakage and joining of deoxynucleic acid"
J. Biol. Chem. 243:1513-1555.

Westhoff, P., Nelson, N., Bünemann, H., & Herrmann, R.G. (1981)
"Localisation of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome"
Curr. Genet. 4:109-120.

Westhoff, P., Alt, J., & Herrmann, R.G. (1983a)
"Localization of the genes for the two chlorophyll a - conjugated polypeptides (mol. wt. 51 and 44 Kd) of the photosystem II reaction center on the spinach plastid chromosome"
EMBO J. 2:2229-2237.

Westhoff, P., Alt, J., Nelson, N., Bottomley, W., Bünemann, H., & Herrmann, R.G. (1983b)
"Genes and transcripts for the P_{700} chlorophyll a apoprotein and subnit 2 of the photosystem I reaction center complex from spinach thylakoid membranes"
Pl. Mol. Biol. 2:95-107.

Weston, A., Brown, M.G., Perkins, H.R., Sounders, J.R., & Humphreys, G.O. (1981)
"Transformation of Escherichia coli with plasmid DNA. Calciuminduced binding of DNA to whole cells and isolated membrane fractions"
J. Bacteriol. 145:780-787.

Wettstein, F.v. (1926)
"Über plasmatische Vererbung sowie Plasma- und Genwirkung"
Nachr. Ges. Wiss. Göttingen Math.-Phys. Kl. 1926(3):250-281.

Whitfeld P.R. & Bottomley, W. (1980)
"Mapping of the gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase on spinach chloroplast DNA"
Biochem. Int. 1:172-178.

Whitfeld, P.R. & Bottomley, W. (1983)
"Organization and structure of chloroplast genes"
Ann. Rev. Plant Physiol. 34:279-310.

Wilms, H.J. (1981)
"Pollen tube penetration and fertilization in spinach"
Acta. Bot. Neerl. 30:107-122.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.V. Kowallik (Botanisches Institut I der Universität Düsseldorf) danke ich für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Stubbe (Botanisches Institut I der Universität Düsseldorf) bin ich für die Übernahme des Co-Referats sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen dankbar.

Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann (Botanisches Institut IV der Universität Düsseldorf) danke ich für die großzügige Aushändigung klonierter Gene der Plastiden-DNA von Spinat und für wertvolle Diskussionen. Die Mitarbeiter seines Instituts, besonders Cordelia Bisanz, Barbara Schiller, Dr. P. Westhoff und Peter Winter, haben durch wichtige Hinweise bei der Anwendung molekulargenetischer Techniken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. P. Raven und Dr. P. Hoch bin ich für die Zusendung des Samenmaterials und für ihr Interesse an dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Schließlich gilt mein Dank Herrn Dr. O. Wasmund für die Erstellung der Computer-Programme.

Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, den 15. Februar 1985

L E B E N S L A U F

Name:	Udo Klaus Schmitz
geboren:	7. September 1956 in Düsseldorf
Eltern:	Heinz Schmitz, verstorben 1980. Ruth Schmitz, geb. Müller
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Stand:	verheiratet seit 1982 mit Marion Reichert-Schmitz, geb. Reichert

Schulbildung

Volksschule:	1963 - 1967 in Düsseldorf
Gymnasium:	1967 - 1975 in Düsseldorf 16. Juni 1975 Reifezeugnis

Studium

Studienort:	Universität Düsseldorf
Studienfächer:	WS 1975/76 Biologie, Philosophie
Prüfungen:	27. Oktober 1980 Staatsexamen SII in Biologie (Hauptfach) und Philosophie (Nebenfach)
seit November 1980:	Bearbeitung des Dissertationsthemas

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606